

PCT/JPC3/16523

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

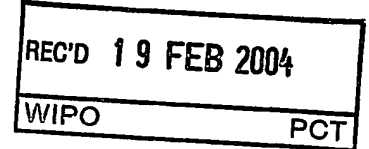
24.12.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年12月24日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-373213  
[ST. 10/C]: [JP2002-373213]



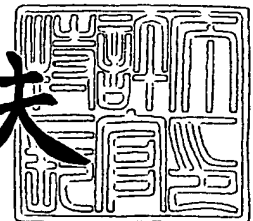
出 願 人  
Applicant(s): 梶原 康宏  
大塚化学株式会社

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 2月 5日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証第2004-3006202

【書類名】 特許願  
【整理番号】 S20225  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C07K 2/00

## 【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区牛久保東2-4-2-205

【氏名】 梶原 康宏

## 【発明者】

【住所又は居所】 徳島県徳島市加賀須野463 大塚化学株式会社研究技術センター内

【氏名】 深江 一博

## 【特許出願人】

【識別番号】 502244258

【氏名又は名称】 梶原 康宏

## 【特許出願人】

【識別番号】 302060306

【氏名又は名称】 大塚化学株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100081536

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 田村 巖

【電話番号】 06-6864-3137

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 020086

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

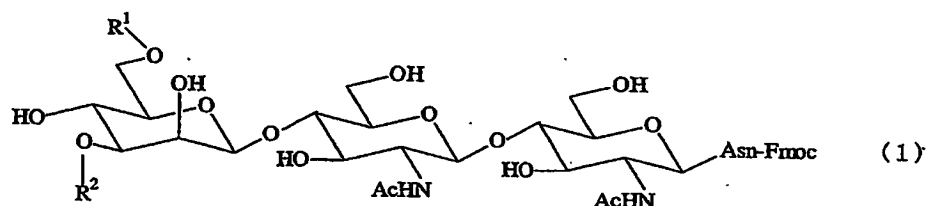
【書類名】 明細書

【発明の名称】 糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギンおよび糖鎖ならびにそれらの製造法

【特許請求の範囲】

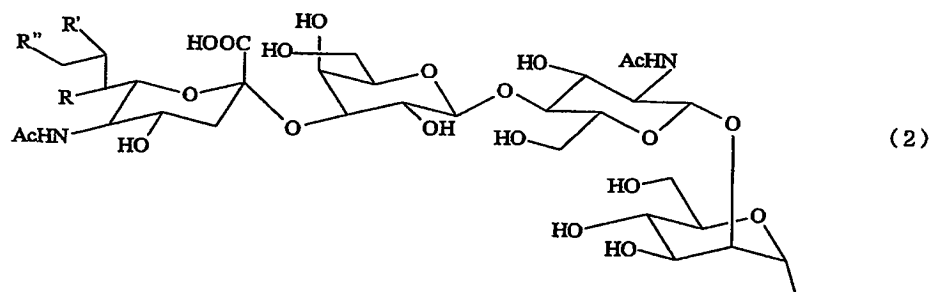
【請求項 1】 下記式 (1) で表される 11～7 糖を有する  $\alpha$  2,3 糖鎖アスパラギン誘導体。

【化 1】



〔式中、 $R^1$  および  $R^2$  は、水素原子、式 (2) ～ (5) で示される基であり、同一でも異なってもよい。ただし、 $R^1$  および  $R^2$  の一方は必ず式 (2) で示される基である。〕

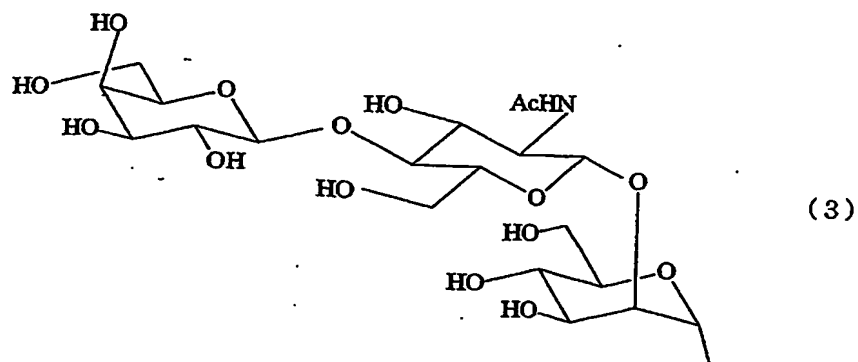
【化 2】



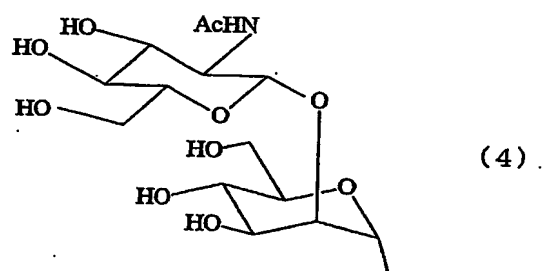
$R$ ,  $R'$ ,  $R''$  は下記の組合せを示す。

- (a)  $R = F$ ,  $R' = OH$ ,  $R'' = OH$
- (b)  $R = OH$ ,  $R' = F$ ,  $R'' = OH$
- (c)  $R = OH$ ,  $R' = OH$ ,  $R'' = F$
- (d)  $R = OH$ ,  $R' = OH$ ,  $R'' = OH$

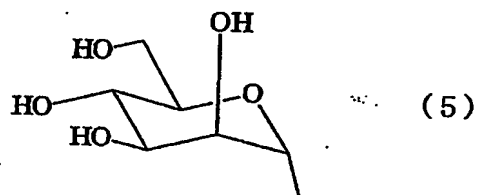
【化3】



【化4】

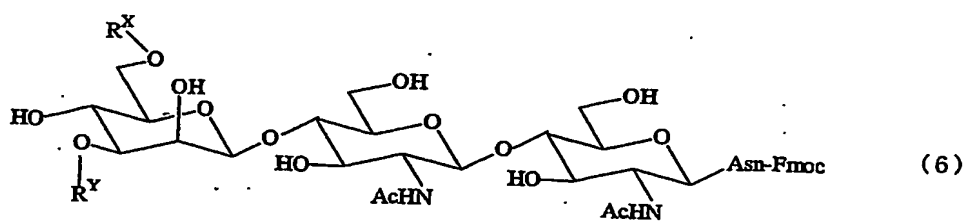


【化5】



【請求項2】 下記式(6)で表されるフッ素を含む11~7糖を有する $\alpha$ 2,6糖鎖アスパラギン誘導体。

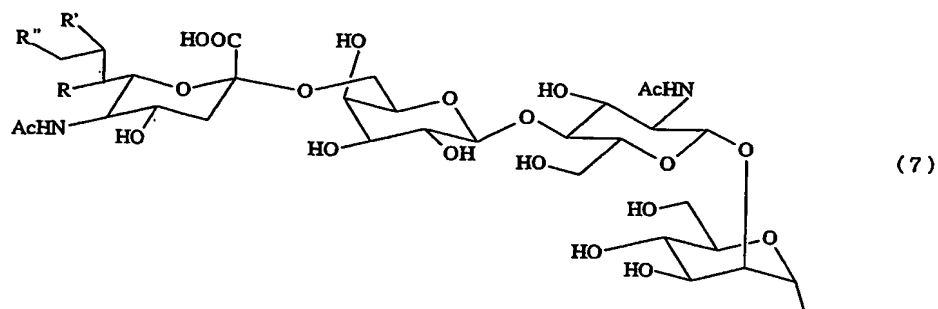
【化6】



〔式中、 $R^X$ および $R^Y$ は、水素原子、式(7)で示される基、または式(3)

～(5)で示される基である。ただし、 $R^X$ および $R^Y$ の一方は必ず式(7)で示される基である。]

【化7】

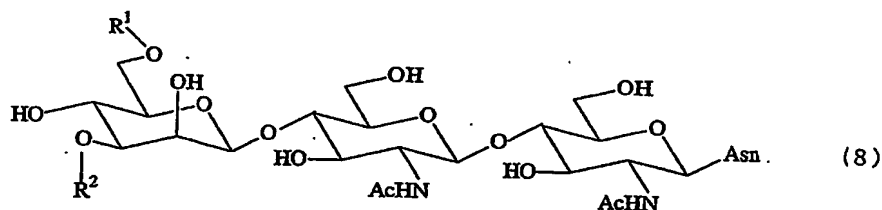


$R$ ,  $R'$ ,  $R''$  は下記の組合せを示す。

- (a)  $R = F$ ,  $R' = OH$ ,  $R'' = OH$
- (b)  $R = OH$ ,  $R' = F$ ,  $R'' = OH$
- (c)  $R = OH$ ,  $R' = OH$ ,  $R'' = F$

【請求項3】 下記式(8)で表される11～7糖を有する $\alpha$ 2,3糖鎖アスパラギン。

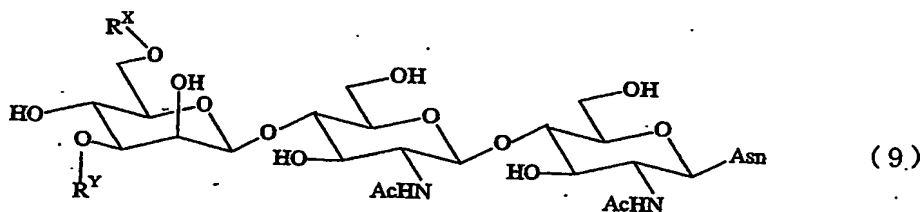
【化8】



[式中、 $R^1$ および $R^2$ は上記に同じ。]

【請求項4】 下記式(9)で表されるフッ素を含む11～7糖を有する $\alpha$ 2,6糖鎖アスパラギン。

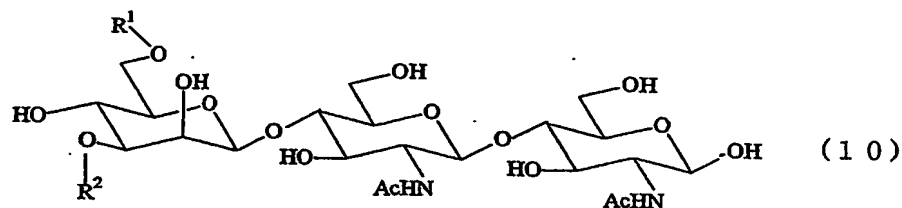
【化9】



[式中、 $R^X$ および $R^Y$ は上記に同じ。]

【請求項 5】 下記式 (10) で表される 11~7 糖を有する  $\alpha$  2, 3 糖鎖

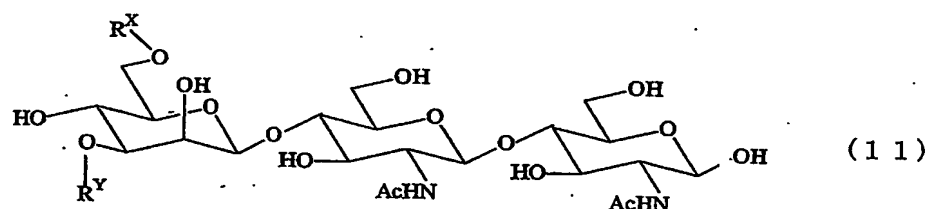
【化 10】



〔式中、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は上記に同じ。〕

【請求項 6】 下記式 (11) で表されるフッ素を含む 11~7 糖を有する  $\alpha$  2, 6 糖鎖。

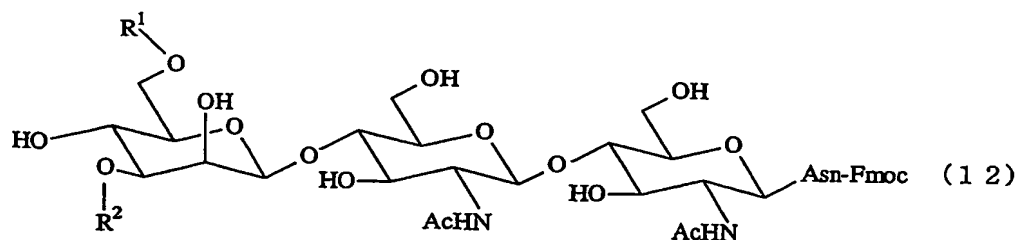
【化 11】



〔式中、R<sup>X</sup> および R<sup>Y</sup> は上記に同じ。〕

【請求項 7】 脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギンをシアル酸転移酵素を用いてシアル酸あるいはシアル酸の誘導体を転移させ、得られた脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギンをクロマトグラフィーに供することにより分離することを特徴とする下記式 (12) で表される 11 糖を有する  $\alpha$  2, 3 ジシアロ糖鎖アスパラギン誘導体の製造法。

【化 12】

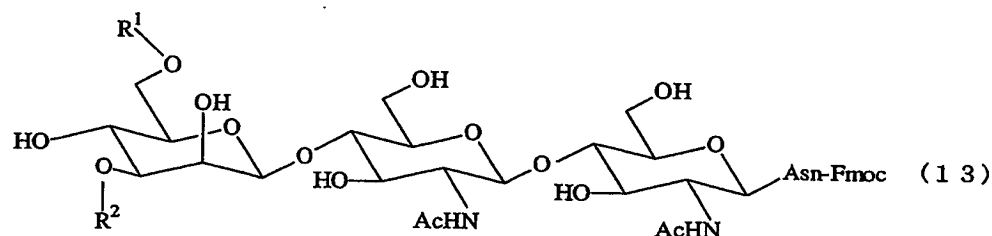


〔式中、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、共に式 (2) で示される基である。〕

【請求項 8】 脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギンをシアル酸転

移酵素を用いてシアル酸あるいはシアル酸の誘導体を転移させ、得られた脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギンをクロマトグラフィーに供することにより分離することを特徴とする下記式(13)で表される10糖を有する $\alpha$ 2,3モノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体の製造法。

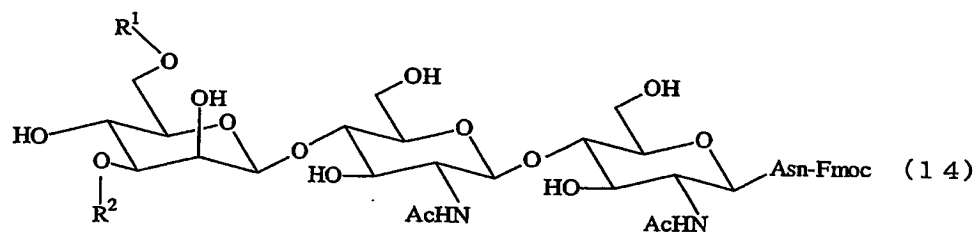
【化13】



〔式中、 $R^1$ 、 $R^2$ の一方は式(2)で示される基、他方は式(3)で示される基である。〕

【請求項9】 式(13)で表されるモノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体をガラクトース加水分解酵素を用いて加水分解することを特徴とする下記式(14)で表される9糖を有する $\alpha$ 2,3モノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体の製造法。

【化14】

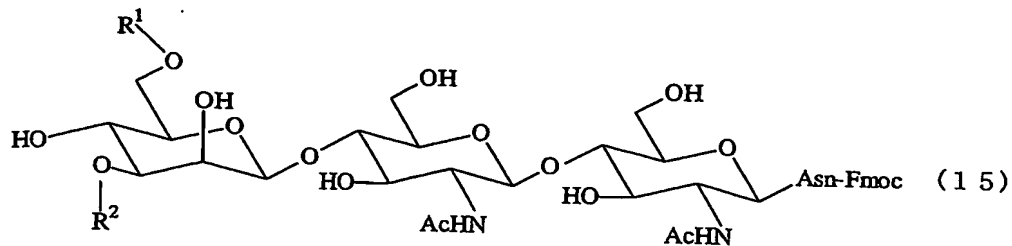


〔式中、 $R^1$ 、 $R^2$ の一方は式(2)で示される基、他方は式(4)で示される基である。〕

【請求項10】 式(14)で表されるモノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体をN-アセチルグルコサミン加水分解酵素を用いて加水分解することを特徴とする下記式(15)で表される8糖を有する $\alpha$ 2,3モノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体の製造法。



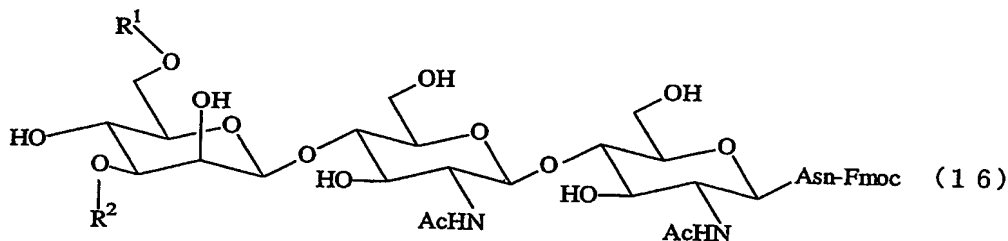
## 【化15】



〔式中、 $R^1$ 、 $R^2$ の一方は式(2)で示される基、他方は式(5)で示される基である。〕

【請求項11】 式(15)で表されるモノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体をマンノース加水分解酵素を用いて加水分解することを特徴とする下記式(16)で表される7糖を有する $\alpha$ 2,3モノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体の製造法。

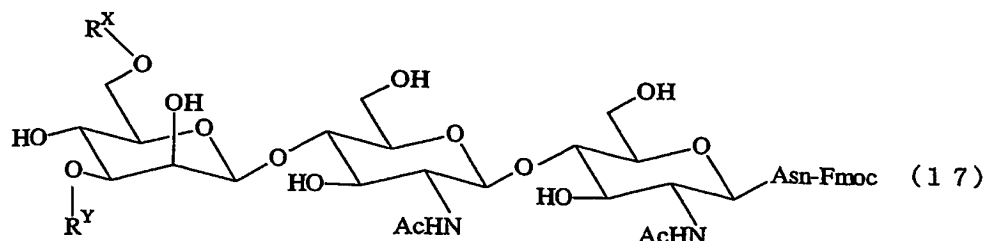
## 【化16】



〔式中、 $R^1$ 、 $R^2$ の一方は式(2)で示される基、他方は水素原子である。〕

【請求項12】 脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギンをシアル酸転移酵素を用いてシアル酸あるいはシアル酸の誘導体を転移させ、得られた脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギンをクロマトグラフィーに供することにより分離することを特徴とする下記式(17)で表される11糖を有する $\alpha$ 2,6ジシアロ糖鎖アスパラギン誘導体の製造法。

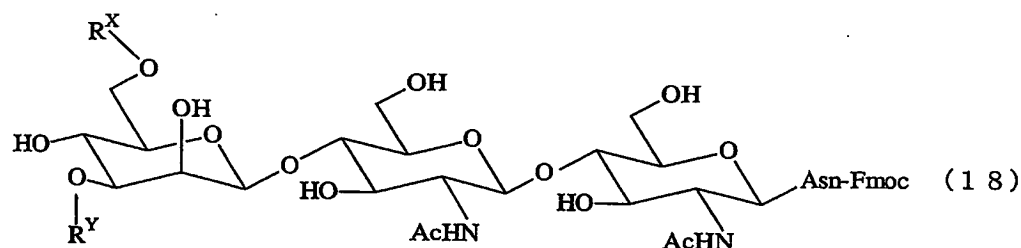
## 【化 17】



〔式中、 $R^X$ および $R^Y$ は、共に式(7)で示される基である。〕

【請求項13】 脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギンをシアル酸転移酵素を用いてシアル酸あるいはシアル酸の誘導体を転移させ、得られた脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギンをクロマトグラフィーに供することにより分離することを特徴とする下記式(18)で表される10糖を有する $\alpha$ 2,6モノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体の製造法。

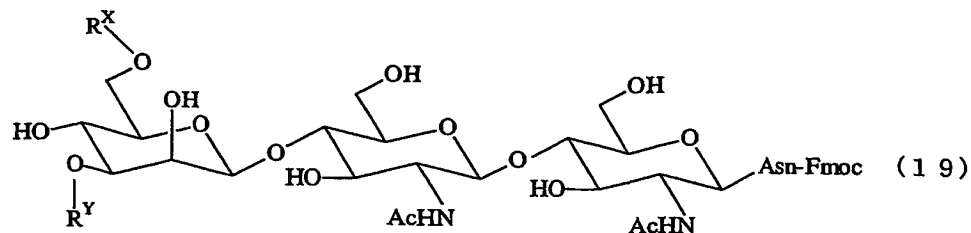
## 【化 18】



〔式中、 $R^X$ および $R^Y$ の一方は式(7)で示される基、他方は式(3)で示される基である。〕

【請求項14】 式(18)で表されるモノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体をガラクトース加水分解酵素を用いて加水分解することを特徴とする下記式(19)で表される9糖を有する $\alpha$ 2,6モノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体の製造法。

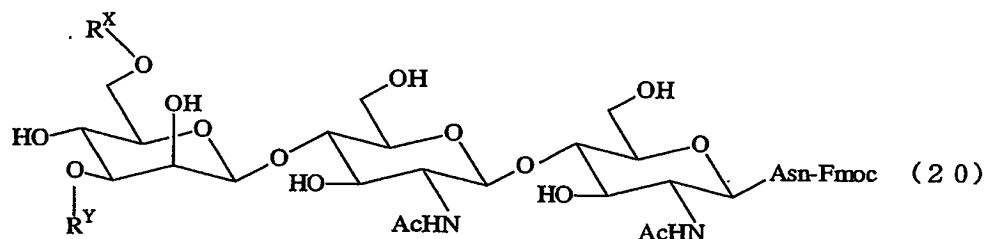
## 【化 19】



〔式中、 $R^X$ および $R^Y$ の一方は式(7)で示される基、他方は式(4)で示される基である。〕

【請求項15】 式(19)で表されるモノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体をN-アセチルグルコサミン加水分解酵素を用いて加水分解することを特徴とする下記式(20)で表される8糖を有する $\alpha$ 2,6モノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体の製造法。

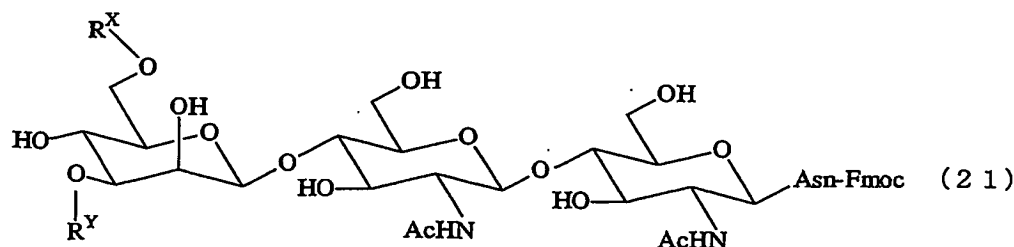
## 【化 20】



〔式中、 $R^X$ および $R^Y$ の一方は式(7)で示される基、他方は式(5)で示される基である。〕

【請求項16】 式(20)で表されるモノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体をマンノース加水分解酵素を用いて加水分解することを特徴とする下記式(21)で表される7糖を有する $\alpha$ 2,6モノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体の製造法。

## 【化 21】



〔式中、 $R^X$ および $R^Y$ の一方は式(7)で示される基、他方は水素原子である。〕

【請求項17】 式(1)で表される11～7糖を有する $\alpha$ 2,3糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去することを特徴とする式(8)で表される11～7糖を有する $\alpha$ 2,3糖鎖アスパラギンの製造法。

【請求項18】 式(6)で表される11～7糖を有する $\alpha$ 2,6糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去することを特徴とする式(9)で表される11～7糖を有する $\alpha$ 2,6糖鎖アスパラギンの製造法。

【請求項19】 式(8)で表される11～7糖を有する $\alpha$ 2,3糖鎖アスパラギンのアスパラギン残基を除去することを特徴とする式(10)で表される11～7糖を有する $\alpha$ 2,3糖鎖の製造法。

【請求項20】 式(9)で表される11～7糖を有する $\alpha$ 2,6糖鎖アスパラギンのアスパラギン残基を除去することを特徴とする式(11)で表される11～7糖を有する $\alpha$ 2,6糖鎖の製造法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギンおよび糖鎖ならびにそれらの製造法に関する。

##### 【0002】

#### 【従来の技術】

近年、核酸(DNA)、タンパク質に続く第三の鎖状生命分子として、糖鎖分子が注目されてきている。ヒトの体は、約60兆個の細胞から成っている一大細胞社会であり、全ての細胞表面は糖鎖分子によって覆われている。例えば、ABO式血液型は細胞表面の糖鎖の違いにより決定されている。

糖鎖は、細胞間の認識や相互作用に関わる働きをもち、細胞社会を成り立たせる要となっている。細胞社会の乱れは、癌、慢性疾患、感染症、老化などにつながる。

##### 【0003】

例えば、細胞が癌化すると糖鎖の構造変化が起こることが分かっている。また、コレラ菌やインフルエンザウイルスなどは、ある特定の糖鎖を認識し結合することにより、細胞に侵入し感染することが知られている。

糖鎖機能の解明は、新しい原理に基づく医薬品や食品の開発などをもたらし、病気の予防、治療に貢献するなど、幅広い応用が期待されている。

糖鎖は単糖の配列、結合様式・部位、鎖の長さ・分岐様式、全体の高次構造などの多様性から、核酸やタンパク質の構造と比べると非常に複雑な構造である。従って、その構造に由来する生物学的な情報は核酸やタンパク質に比べて多種多様である。糖鎖は、研究の重要性を認識されながらも、その構造の複雑さや多様性により、核酸やタンパク質に比べて研究の推進が遅れている状況にある。

#### 【0004】

上記のように細胞膜表面や血清などに存在するタンパク質の多くは糖鎖が結合している。糖鎖がタンパク質に共有結合した分子は糖タンパク質とよばれ、糖とタンパク質との結合様式の違いから2つのグループに分けることができる。一つはアスパラギン (A s n) の側鎖のアミノ基と糖鎖が結合したアスパラギン結合型糖鎖 (N-グリコシド結合型) である。もう一方はセリン (S e r) やトレオニン (T h r) のアルコールに糖鎖が結合したムチン結合型糖鎖 (O-グリコシド結合型) である。すべてのアスパラギン結合型糖鎖は5つの糖残基からなる基本骨格をもち、結合する糖鎖の非還元末端の糖残基の種類によって高マンノース型、複合型、混成型のサブグループに分類される。一方ムチン結合型糖鎖は基本骨格 (コア) の違いから4グループに分類される。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

このように糖鎖は重要な化合物ではあるが、糖鎖の絶対量の不足がある。糖鎖を得る手段として、生体内に存在する糖タンパク質から糖鎖だけを遊離させる方法がある。しかし糖タンパク質から糖鎖を大量に切り出すのは、困難であり、生体内には構造が酷似した糖鎖が多く存在し、単一の糖鎖のみを大量に得るのは難しい。また、生体内に存在しない糖鎖は、大量に入手するのは困難である。

#### 【0006】

本発明の課題は、少なくとも 1 種以上のシアル酸あるいはシアル酸の誘導体を非還元末端に含む新規な糖鎖アスパラギン誘導体とその製造方法を提供することにある。

また本発明の課題は、少なくとも 1 種以上のシアル酸あるいはシアル酸の誘導体を非還元末端に含む新規な糖鎖アスパラギンとその製造方法を提供することにある。

また本発明の課題は、少なくとも 1 種以上のシアル酸あるいはシアル酸の誘導体を非還元末端に含む新規な糖鎖とその製造方法を提供することにある。

【0007】

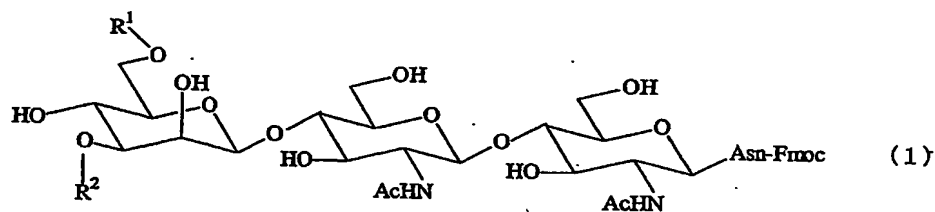
【課題を解決するための手段】

本発明は、下記の発明に係る。

1. 式 (1) で表される 11～7 糖を有する  $\alpha$  2, 3 糖鎖アスパラギン誘導体及びその製造法。

【0008】

【化 2 2】

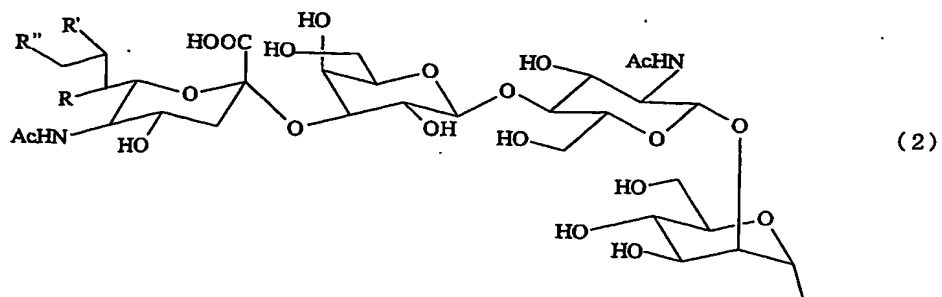


【0009】

〔式中、 $R^1$  および  $R^2$  は、水素原子、式 (2) ～ (5) で示される基であり、同一でも異なってもよい。ただし、 $R^1$  および  $R^2$  の一方は必ず式 (2) で示される基である。〕

【0010】

## 【化 2 3】



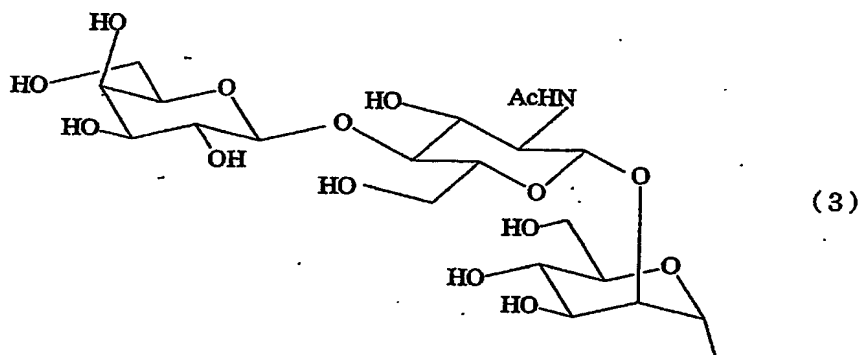
## 【0011】

R, R', R'' は下記の組合せを示す。

- (a) R=F、R' =OH、R'' =OH
- (b) R=OH、R' =F、R'' =OH
- (c) R=OH、R' =OH、R'' =F
- (d) R=OH、R' =OH、R'' =OH

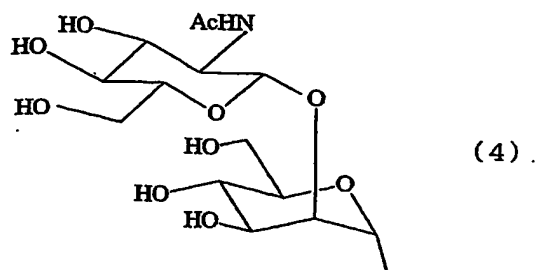
## 【0012】

## 【化 2 4】



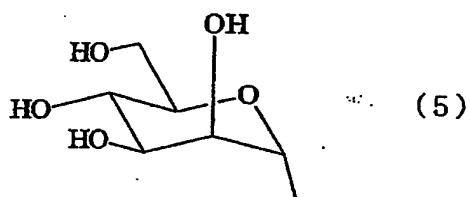
## 【0013】

## 【化 25】



## 【0014】

## 【化 26】

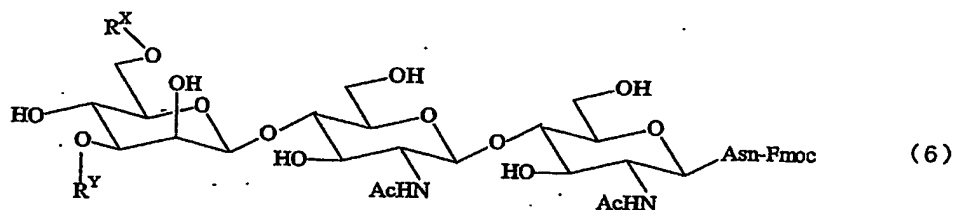


## 【0015】

2. 式 (6) で表されるフッ素を含む 11~7 糖を有する  $\alpha$  2,6 糖鎖アスパラギン誘導体及びその製造法。

## 【0016】

## 【化 27】



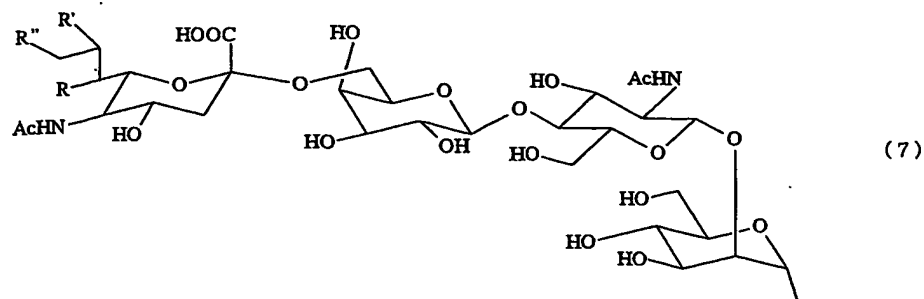
## 【0017】

〔式中、 $R^X$  および  $R^Y$  は、水素原子、式 (7) で示される基、または式 (3) ~ (5) で示される基である。ただし、 $R^X$  および  $R^Y$  の一方は必ず式 (7) で示される基である。〕

## 【0018】



## 【化 28】



## 【0019】

R, R', R'' は下記の組合せを示す。

(a) R=F、R'=OH、R''=OH

(b) R=OH、R'=F、R''=OH

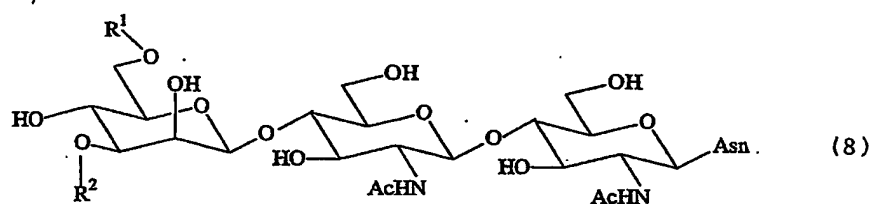
(c) R=OH、R'=OH、R''=F

## 【0020】

3. 式(8)で表される11～7糖を有する $\alpha$ 2,3糖鎖アスパラギン及びその製造法。

## 【0021】

## 【化 29】



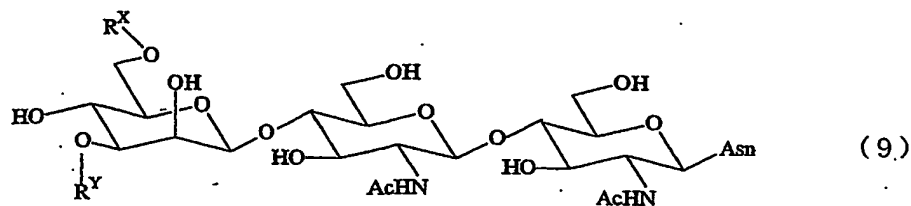
[式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は上記に同じ。]

## 【0022】

4. 式(9)で表されるフッ素を含む11～7糖を有する $\alpha$ 2,6糖鎖アスパラギン及びその製造法。

## 【0023】

## 【化30】



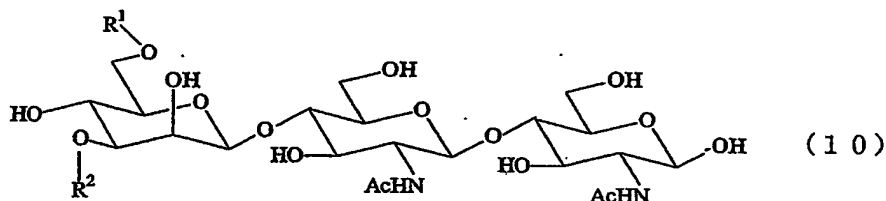
〔式中、 $R^X$ および $R^Y$ は上記に同じ。〕

## 【0024】

5. 式(10)で表される11～7糖を有する $\alpha$ 2,3糖鎖及びその製造法。

## 【0025】

## 【化31】



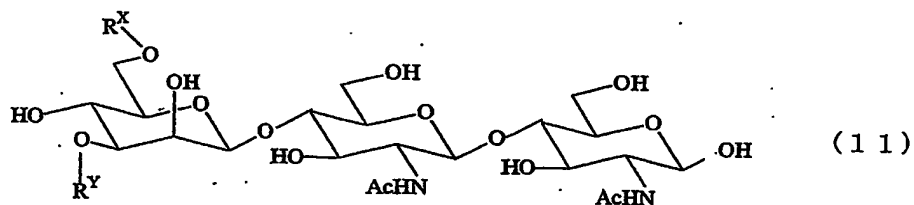
〔式中、 $R^1$ および $R^2$ は上記に同じ。〕

## 【0026】

6. 式(11)で表されるフッ素を含む11～7糖を有する $\alpha$ 2,6糖鎖及びその製造法。

## 【0027】

## 【化32】



〔式中、 $R^X$ および $R^Y$ は上記に同じ。〕

## 【0028】

本発明者は、先に特願2001-185685号(以下、先願という)において、種々の単離された糖鎖アスパラギン誘導体を従来に比べて非常に容易かつ大量に得ることができる、糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギン、糖鎖の製

造方法、更には糖残基が任意に欠失した糖鎖が結合した新規な糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギン、糖鎖を開発した。

【0029】

この先願の方法は例えば

(1) (a) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程、

ならびに

(b) 該糖鎖アスパラギン誘導体混合物または該糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解して得られる混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、

を含む、糖鎖アスパラギン由来の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(2) (b') 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程をさらに含む前記 (1) 記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(3) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物が、下記式 (A) の化合物および／または該化合物において1以上の糖残基が欠失した化合物を含むものである、前記 (1) または (2) 記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(4) 脂溶性の保護基がフルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基である前記 (1) ~ (3) いずれか記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(5) 工程 (a) が、非還元末端にシアル酸残基を有する1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに Fmoc 基を導入し、かつシアル酸残基にベンジル基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程である、前記 (1) ~ (3) いずれか記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

【0030】

(6) (a) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合

物を得る工程、

(b) 該糖鎖アスパラギン誘導体混合物または該糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解して得られる混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、ならびに

(c) 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去して糖鎖アスパラギンを得る工程、

を含む、糖鎖アスパラギンの製造方法、

(7) (b') 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程、および/または

(c') 工程 (c) で得られた糖鎖アスパラギンを糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程、

をさらに含む、前記 (6) 記載の糖鎖アスパラギンの製造方法、

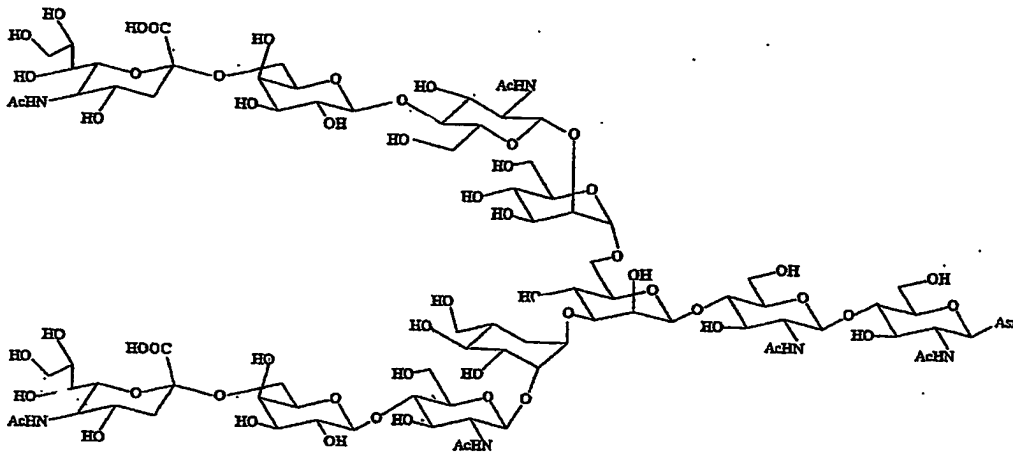
(8) 1 種もしくは 2 種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物が、下記式 (A) の化合物および/または該化合物において 1 以上の糖残基が欠失した化合物を含むものである、前記 (6) または (7) 記載の糖鎖アスパラギンの製造方法、

(9) 脂溶性の保護基が Fmoc 基である前記 (6) ~ (8) いずれか記載の糖鎖アスパラギンの製造方法、

(10) 工程 (a) が、非還元末端にシアル酸残基を有する 1 種もしくは 2 種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに Fmoc 基を導入し、かつシアル酸残基にベンジル基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程である、前記 (6) ~ (8) いずれか記載の糖鎖アスパラギンの製造方法などである。

【0031】

## 【化33】



(A)

## 【0032】

これら糖鎖アスパラギン誘導体及び糖鎖アスパラギンの製造についての詳細は、上記先願に述べられているので、これを引用する。しかし若干先願の内容について述べると、先願の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法は、たとえば、天然の糖タンパク質に由来する糖鎖アスパラギン、好ましくはアスパラギン結合型糖鎖から得られる糖鎖アスパラギンの混合物に含まれる当該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入（結合）して糖鎖アスパラギン誘導体の混合物を得た後に当該混合物を各糖鎖アスパラギン誘導体に分離することを1つの大きな特徴とする。なお、本明細書において、「糖鎖アスパラギン」とはアスパラギンが結合した状態の糖鎖をいう。また、「アスパラギン結合型糖鎖」とはタンパク質のポリペプチド中のアスパラギン（Asn）の酸アミノ基に、還元末端に存在するN-アセチルグルコサミンがN-グリコシド結合した糖鎖群であって、Man ( $\beta 1-4$ ) GlcNAc ( $\beta 1-4$ ) GlcNAcを母核とする糖鎖群をいう。「糖鎖アスパラギン誘導体」とはアスパラギン残基に脂溶性の保護基が結合した状態の糖鎖アスパラギンをいう。また、化合物の構造式中、「AcHN」はアセトアミド基を示す。

## 【0033】

前記するように、天然の糖タンパク質に由来する糖鎖は非還元末端の糖残基がランダムに欠失した糖鎖の混合物である。本発明者らは、意外にも天然の糖タン

パク質に由来する糖鎖、具体的には糖鎖アスパラギンの混合物に含まれる当該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入することで、当該保護基が導入された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物を公知のクロマトグラフィーの手法を用いて容易に個々の糖鎖アスパラギン誘導体に分離することができることを見出した。それにより、種々の構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体をそれぞれ大量に調製することが可能となった。たとえば、従来分離が困難であった類似構造の糖鎖アスパラギン誘導体同士の分離が可能となり、それらの化合物を各々、容易かつ大量に調製することができる。また、得られた糖鎖アスパラギン誘導体を元に、たとえば、糖加水分解酵素を順次作用させて糖残基を除去することにより、さらに様々な糖鎖アスパラギン誘導体を合成することもできる。

#### 【0034】

このように、糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して誘導体化することにより個々の糖鎖アスパラギン誘導体の分離が可能となったが、これは、脂溶性の保護基を導入したことにより糖鎖アスパラギン誘導体の全体の脂溶性が高まり、たとえば、好適に使用される逆相系カラムとの相互作用が格段に向上し、その結果、より鋭敏に糖鎖構造の差を反映して個々の糖鎖アスパラギン誘導体が分離されるようになったことによると考えられる。

さらに、先願によれば、得られた糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去することにより種々の糖鎖アスパラギンを、人工的に容易かつ大量に得ることができる。

しかし、上記先願で得られる糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギン及び糖鎖はいずれも  $\alpha 2, 6$  結合体のものであった。

本発明では、上記先願に記載のない  $\alpha 2, 3$  結合体の糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギン及び糖鎖、並びに  $\alpha 2, 6$  結合体のもので更にフッ素を含む、いずれも新規な糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギン及び糖鎖を得るものである。

#### 【0035】

ここで、 $\alpha 2, 3$  結合体と  $\alpha 2, 6$  結合体の相異について以下に説明する。

$\alpha 2, 3$  結合体、 $\alpha 2, 6$  結合体とは、シアル酸とガラクトースとの結合様式を

表わすものである。前者は、シアル酸の2位の炭素と、ガラクトースの3位の炭素が $\alpha$ 結合しているものをいい、後者は、シアル酸の2位の炭素と、ガラクトースの6位の炭素が $\alpha$ 結合しているものをいう。これらは、ガラクトースとの結合炭素の違いではある。

#### 【0036】

しかしながらこの違いは、例えば、インフルエンザウイルスは、シアル酸を末端に持つ糖鎖をレセプターとして認識している。しかし、ヒトとトリのインフルエンザウイルスではレセプター特異性が異なっている。前者は、シアル酸がガラクトースに $\alpha 2, 6$ 結合した糖鎖を、後者はシアル酸がガラクトースに $\alpha 2, 3$ 結合した糖鎖を特異的に認識する。シアル酸-ガラクトース間の結合様式の違い、さらにはシアル酸の相違が、インフルエンザウイルスの宿主域の制限に大きな役割を果たしていることが知られている。

本発明では、このように先願には記載のない新規な糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギン及び糖鎖、並びにそれらの製造法に係るものである。

#### 【0037】

##### 【発明の実施の形態】

本発明の方法においては先ず、出発化合物である脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギン（9糖-A s n -F m o c）をシアル酸転移酵素を用いてシアル酸あるいはシアル酸の誘導体を転移させ、得られた脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギンをクロマトグラフィーに供することにより分離し、脂溶性の保護基で保護されたジシアロ糖鎖アスパラギン誘導体および2種のモノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体を得られる。

#### 【0038】

当該保護基としては特に限定されるものではなく、例えば、F m o c基やt-ブチルオキシカルボニル（B o c）基、ベンジル基、アリル基、アリルオキシカーボネート基、アセチル基等の、カーボネート系またはアミド系の保護基等を使用することができる。得られた糖鎖アスパラギン誘導体を直ちに所望の糖ペプチドの合成に使用できるという観点から、当該保護基としては、F m o c基またはB o c基などが好ましく、F m o c基がより好ましい。F m o c基はシアル酸等

比較的酸性条件に不安定な糖が糖鎖に存在する場合に特に有効である。また、保護基の導入は公知の方法（たとえば、Protecting groups in Organic chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6を参照）に従って行えばよい。

#### 【0039】

たとえば、Fmoc基を用いる場合、糖鎖アスパラギンに対しアセトンを適量加えた後、さらに9-フルオレニルメチル-N-スクシニミジルカーボネートと炭酸水素ナトリウムを加えて溶解し、25℃にてアスパラギン残基へのFmoc基の結合反応を行うことにより、当該糖鎖アスパラギンのアスパラギン残基にFmoc基を導入することができる。

以上の操作により、脂溶性の保護基が導入された糖鎖アスパラギン誘導体が得られる。

シアル酸としては、一般に市販されているシアル酸あるいは化学合成したものをを用いることができる。

#### 【0040】

シアル酸の誘導体としては、一般に市販されているシアル酸の誘導体あるいは化学合成したものをを用いることができる。具体的には、シアル酸の7位、8位あるいは9位の炭素に結合している水酸基を水素原子あるいはハロゲン原子で置換したものを挙げることができる。ハロゲン原子としては、フッ素、塩素、臭素等を挙げることができるが、好ましくはフッ素がよい。

シアル酸転移酵素としては、一般に市販されているシアル酸転移酵素を用いることができ、転移させるシアル酸あるいはシアル酸の誘導体の種類により適宜選択することができる。具体的には、 $\alpha 2,3$ 転移酵素であるRat Recombinant由来のもの、 $\alpha 2,6$ 転移酵素であるRat Liver由来のものを挙げることができる。また、シアリターゼをもちいてpH調整等により平衡をずらすことにより、シアル酸あるいはシアル酸の誘導体を転移させてもよい。

上記糖鎖アスパラギン誘導体のクロマトグラフィーによる分離は、適宜、公知のクロマトグラフィーを単独でまたは複数組み合わせるにより行うことができる。



## 【0041】

たとえば、得られた糖鎖アスパラギン誘導体混合物をゲル濾過カラムクロマトグラフィーで精製後、HPLCを用いて精製する。HPLCにおいて用い得るカラムとしては逆相系のカラムが好適であり、たとえば、ODS、Phenyl系、ニトリル系や、陰イオン交換系のカラム、具体的には、たとえば、ファルマシア社製モノQカラム、イヤترون社製イアトロビーズカラムなどが利用可能である。分離条件等は適宜、公知の条件を参照して調整すればよい。以上の操作により、糖鎖アスパラギン誘導体混合物から所望の各糖鎖アスパラギン誘導体を得ることができる。

以上の操作により、たとえば、保護基がFmoc基である場合、式(12)、(13)、(17)、(18)の糖鎖アスパラギン誘導体を単独又は混合物の形で得ることができる。

## 【0042】

次に、上記で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解することにより、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を効率的に得ることができる。たとえば、糖鎖アスパラギン誘導体を分離する段階においては混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体の種類を制限して糖鎖アスパラギン誘導体を大まかに分離し、次いで加水分解、たとえば、糖加水分解酵素を用いて加水分解することにより所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を効率的に得ることができる。なお、加水分解は前記と同様に行うことができる。特に、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体をより効率的に得る観点から、糖残基の切断様式が明確な糖加水分解酵素を用いて加水分解するのが好ましい。

## 【0043】

たとえば、ガラクトース残基の除去は、加水分解される化合物を緩衝液（たとえば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、グッド緩衝溶液など）に溶かし、公知の条件に従ってガラクトース加水分解酵素を用いてガラクトース残基の切断反応を行うことにより成し得る。なお、加水分解される化合物は各々単離されたものであっても混合物であってもよい。この反応で用いるガラクトース加水分解酵素は市販されている公知のエキシ型の酵素を利用するのが好ましい。また、同様の活

性を有するものであれば、新たに単離された酵素、遺伝子工学的に創製された酵素であってもよい。次いで、前記と同様にして、反応後に得られる反応液（糖残基が切断された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物）をクロマトグラフィーに供し、各糖鎖アスパラギン誘導体を得ればよい。たとえば、分離はHPLC（ODSカラム、展開溶媒は50 mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル＝82：15）で行うのが好ましい。

#### 【0044】

N-アセチルグルコサミン残基の除去は、加水分解される化合物を緩衝液（たとえば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、グッド緩衝溶液など）に溶かし、公知の条件に従ってN-アセチルグルコサミン加水分解酵素を用いてN-アセチルグルコサミン残基の切断反応を行うことにより成し得る。また、N-アセチルヘキソサミニダーゼ加水分解酵素を用いてもよい。なお、加水分解される化合物は各々単離されたものであっても混合物であってもよい。この反応で用いる各酵素は市販されているエキソ型の酵素を利用するのが好ましい。また、同様の活性を有するものであれば、新たに単離された酵素、遺伝子工学的に創製された酵素であってもよい。次いで、前記と同様にして、反応後に得られる反応液（糖残基が切断された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物）をクロマトグラフィーに供し、各糖鎖アスパラギン誘導体を得ればよい。たとえば、分離はHPLC（ODSカラム、展開溶媒は50 mM酢酸アンモニウム水溶液：メタノール＝65：35または50 mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル＝82：15）で行うのが好ましい。

#### 【0045】

マンノース残基の除去は、加水分解される化合物を緩衝液（たとえば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、グッド緩衝溶液など）に溶かし、公知の条件に従ってマンノース加水分解酵素を用いてマンノース残基の切断反応を行うことにより成し得る。なお、加水分解される化合物は各々単離されたものであっても混合物であってもよい。この反応で用いるマンノース加水分解酵素は市販されているエキソ型の酵素を利用するのが好ましい。また、同様の活性を有するものであれば、新たに単離された酵素、遺伝子工学的に創製された酵素であってもよい。次いで

、前記と同様にして、反応後に得られる反応液（糖残基が切断された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物）をクロマトグラフィーに供し、各糖鎖アスパラギン誘導体を得ればよい。たとえば、分離はHPLC（ODSカラム、展開溶媒は、10～200mM程度の酢酸アンモニウムなどの緩衝溶液とアセトニトリル、あるいはエタノール、あるいはメタノール、あるいはブタノール、あるいはプロパノールなどの脂溶性のある水溶性有機溶剤を適宜混ぜて用いることができる。ここに例示する場合、展開溶媒としては50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル＝82：18が好適である）で行うのが好ましい。

#### 【0046】

このように、各糖鎖アスパラギン誘導体を得た後、さらに各種糖加水分解酵素等を用いて当該誘導体を加水分解し、糖鎖の非還元末端の糖残基を除去することにより、たとえば、糖鎖の末端の分岐構造が不均一な様々な糖鎖アスパラギン誘導体をそれぞれ単一化合物として得ることができる。また、種々の糖加水分解酵素を用い、加水分解する順番やその種類を変えることで、より多くの種類の糖鎖アスパラギン誘導体を製造することができる。

#### 【0047】

従来の方法によれば、極限られた糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を分析スケールで得るのにさえ膨大な時間とコストが必要であったが、本発明によれば、特別の装置や試薬を必要とすることなく、慣用のゲルろ過カラム、HPLCカラムや、少なくとも3種類の糖加水分解酵素（たとえば、ガラクトース加水分解酵素、マンノース加水分解酵素、N-アセチルグルコサミン加水分解酵素）等を使って、2週間程度で所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を1グラム程度調製することが可能である。

以上の操作により、たとえば、保護基がFmoc基である場合、式（14）～（16）、（19）～（21）の糖鎖アスパラギン誘導体を単独又は混合物の形で得ることができる。

#### 【0048】

また本発明は、種々の単離された糖鎖アスパラギンを大量に得ることができる糖鎖アスパラギンの製造方法を提供する。当該方法は、前記糖鎖アスパラギン誘

導体の製造方法に従う糖鎖アスパラギン誘導体の製造工程に続き、さらに、得られた糖鎖アスパラギン誘導体から保護基を除去する工程を含むものである。

#### 【0049】

糖鎖アスパラギン誘導体からの保護基の除去は、公知の方法に従って行うことができる（たとえば、Protecting groups in Organic chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6を参照）。たとえば、保護基がFmoc基である場合、N,N-ジメチルホルムアミド（DMF）中、糖鎖アスパラギン誘導体にモルホリンを加えて反応を行うことによりFmoc基を除去することができる。また、Boc基は弱酸を反応させることで除去することができる。保護基除去後、所望により適宜、公知の方法、たとえば、ゲル濾過カラム、イオン交換カラムなどを使用する各種クロマトグラフィーや、HPLCによる分離という方法によって精製することにより、糖鎖アスパラギンを得てもよい。

以上の操作により、たとえば、式（8）、（9）の糖鎖アスパラギンを単独又は混合物の形で得ることができる。

#### 【0050】

さらに本発明は、種々の単離された糖鎖を大量に得ることができる糖鎖の製造方法を提供する。当該方法は、前記糖鎖アスパラギンの製造方法に従う糖鎖アスパラギンの製造工程に続き、さらに、得られた糖鎖アスパラギンからアスパラギン残基を除去する工程を含むものである。

糖鎖アスパラギンからのアスパラギン残基の除去は、公知の方法に従って行うことができる。たとえば、糖鎖アスパラギンを無水ヒドラジンと反応させた後、アセチル化することによりアスパラギン残基を除去して糖鎖を得ることができる。また、糖鎖アスパラギンを塩基性水溶液で加熱還流後、アセチル化することによってもアスパラギン残基を除去して糖鎖を得ることができる。アスパラギン残基除去後、所望により適宜、公知の方法、たとえば、ゲル濾過カラム、イオン交換カラムなどを使用する各種クロマトグラフィーや、HPLCによる分離という方法によって精製してもよい。

以上の操作により、たとえば、式（10）、（11）の糖鎖を単独又は混合物の形で得ることができる。

## 【0051】

このように、本発明によれば、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギンおよび糖鎖（以下、3つ併せて糖鎖類という場合がある）を安価かつ効率的に大量に製造することができる。

かかる糖鎖類は医薬品開発等の分野において非常に有用である。たとえば、医薬品開発における応用例としては、たとえば、ガンのワクチン合成があげられる。細胞がガン化すると体内にはなかった糖鎖が発現することが知られている。また、当該糖鎖を化学的に合成し、ワクチンとして個体に投与すると、ガンの増殖が抑制されることも知られている。そこで、本発明により所望の糖鎖類を製造することができれば、ガンの治療に有効なワクチンの合成を行うことが可能である。また、本発明により得られる糖鎖類を、さらに化学的な反応および糖転移酵素による反応などを組み合わせて新たな糖残基を結合させて誘導体化し、新規なワクチンの合成を行うことも可能である。

## 【0052】

## 【実施例】

以下に実施例を挙げて説明するが、本発明は何らこれら実施例に限定されるものではない。

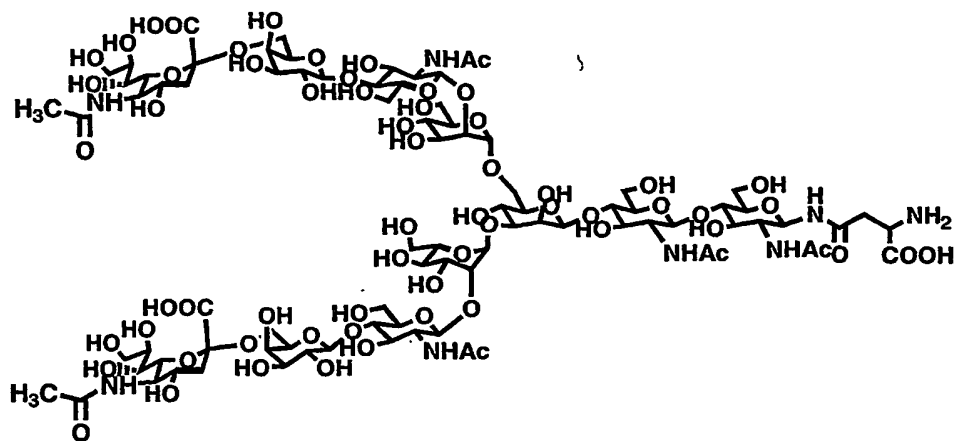
## 【0053】

参考例1 ジシアロ $\alpha$ 2,6糖鎖アスパラギン（S-1）の合成

粗精製のSGP（シアリルグリコペプチド）500mgとアジ化ナトリウム10mg（319 $\mu$ mol）をトリスー塩酸・塩化カルシウム緩衝溶液（TRIZMA BASE 0.05mol/リットル、塩化カルシウム0.01mol/リットル、pH=7.5）25mlに溶解させた。これにアクチナーゼE（タンパク質分解酵素、科研製薬）50mgをトリスー塩酸・塩化カルシウム緩衝溶液5mlに溶かした溶液を加え、37℃で静置した。115時間後、この溶液を凍結乾燥した。この残留物をゲルろ過カラムクロマトグラフィーで2回精製し、目的のジシアロ $\alpha$ 2,6糖鎖アスパラギン（S-1）を252mg得た。

## 【0054】

## 【化 3 4】



## 【0055】

$^1\text{H-NMR}$  (30℃)

$\delta$  5.13 (s, 1H, Man 4-H-1), 5.07 (d, 1H,  $J=9.5$  Hz, GlcNAc 1-H-1), 4.95 (s, 1H, Man 4-H-1), 4.77 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.61 (d, 1H,  $J=7.6$  Hz, GlcNAc 2-H-1), 4.60 (d, 2H,  $J=7.6$  Hz, GlcNAc 5, 5-H-1), 4.44 (d, 2H,  $J=8.0$  Hz, Gal 6, 6-H-1), 4.25 (bd, 1H, Man 3-H-2), 4.20 (bdd, 1H, Man 4-H-2), 4.12 (bd, 1H, Man 4-H-2), 2.94 (dd, 1H,  $J=4.5$  Hz, 17.2 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.85 (dd, 1H,  $J=7.0$  Hz, 17.2 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.67, 2.66 (dd, 2H,  $J=4.6$  Hz, 12.4 Hz, NeuAc 7, 7-H-3<sub>eq</sub>), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.06 (s, 6H, Ac $\times$ 2), 2.02 (s, 6H, Ac $\times$ 2), 2.01 (s, 3H, Ac), 1.71 (dd, 2H,  $J=12.4$  Hz, 12.4 Hz, NeuAc 7, 7-H-3<sub>ax</sub>).

## 【0056】

参考例 2 アシアロ糖鎖アスパラギン (S-2) の合成

参考例 1 で得られたジシアロ  $\alpha$  2, 6 糖鎖アスパラギンより特願 2001-185685 号の実施例に準じてアシアロ糖鎖アスパラギンを合成した。その NM

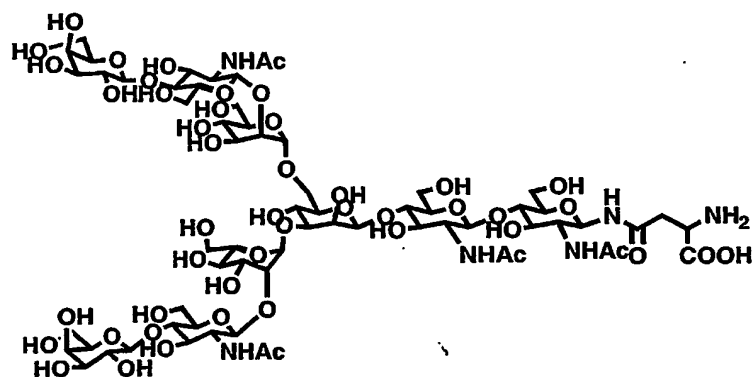
Rデータを下記に示す。

$^1\text{H-NMR}$  (30℃)

$\delta$  5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H,  $J=9.7$  Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.62 (d, 1H,  $J=8.0$  Hz, GlcNAc2-H-1), 4.58 (d, 2H,  $J=7.8$  Hz, GlcNAc5, 5'-H-1), 4.47 (d, 2H,  $J=7.9$  Hz, Gal6, 6'-H-1), 4.24 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.19 (bdd, 1H,  $J=3.2$  Hz, 1.4 Hz, Man4'-H-2), 4.12 (bdd, 1H,  $J=3.2$  Hz, 1.4 Hz, Man4-H-2), 2.93 (dd, 1H,  $J=4.5$  Hz, 17.0 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.93 (dd, 1H,  $J=6.8$  Hz, 17.0 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.05 (s, 6H,  $\text{Ac} \times 2$ ), 2.01 (s, 3H, Ac)

【0057】

【化35】



【0058】

参考例3 Fmoc基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したアシアロ糖鎖アスパラギン (S-3) の合成

参考例2で得られたアシアロ糖鎖アスパラギン (S-2) 0.034 mmolを蒸留水2.7 mlとアセトン4.1 ml混合溶液に溶解させ、これに9-フルオリニルメチル-N-スクシニミジルカーボネート (Fmoc-OSn) 0.103 mmolと炭酸水素ナトリウム0.137 mmolを加え、室温で2時間攪拌

した。TLCで反応終了を確認後この溶液を減圧濃縮し、アセトンを除去した。残渣をオクタデシルシリル基を結合したシリカゲルを充填したカラム（ODSカラム）にかけ精製し、目的のFmoc-アシアロ糖鎖アスパラギン（S-3）を得た。

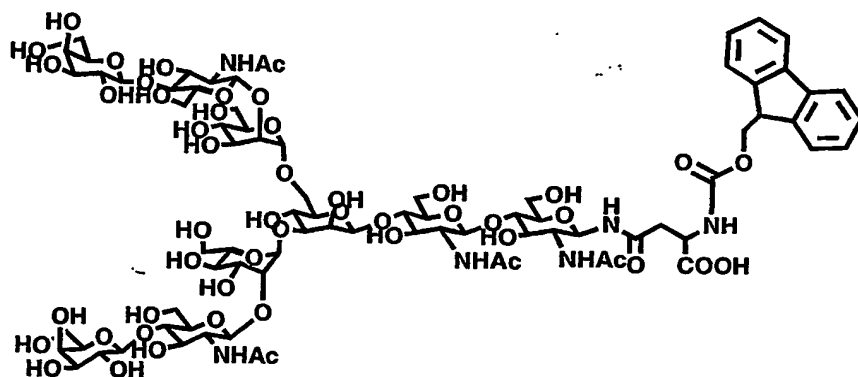
## 【0059】

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ )

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4H, m, Fmoc), 5.12 (1H, s, Man4-H1), 5.06 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.93 (1H, s, Man4'-H1), 4.82 (1H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.67 (2H, d, GlcNAc5, 5'-H1), 4.53 (2H, d, Gal6, 6'-H1), 4.34 (1H, d, Man3-H2), 4.27 (1H, d, Man4'-H2), 4.19 (1H, d, Man4-H2), 3.03 (1H, bdd, Asn- $\beta\text{CH}$ ), 3.00 (1H, bdd, Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.15 (12H, s $\times$ 4, -Ac); HRMS Calcd for  $\text{C}_{81}\text{H}_{120}\text{N}_6\text{NaO}_{50}$  [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ] 1999.6930, found 1999.6939.

## 【0060】

【化36】



## 【0061】

参考例4 (5-アセタミド-3,5,7-トリデオキシー-7-フルオロ-D-グ

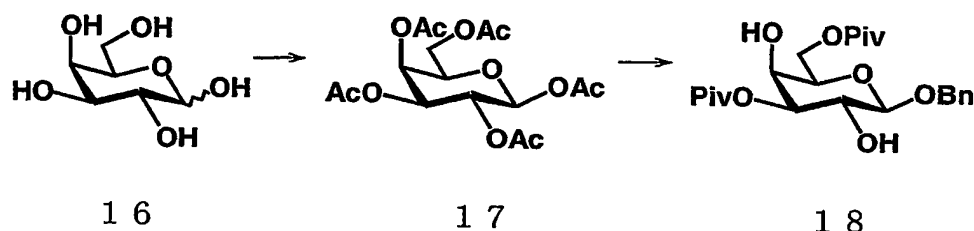


リセローβ-D-ラクト-2-ノヌロピラノシドニック アシッド (7-フル  
オロシアル酸)

5-Acetamide-3,5,7-trideoxy-7-fluoro-  
D-glycero-β-D-galacto-2-nonulopyrano  
sidonic acid 25の合成)

【0062】

【化37】



【0063】

(1) 化合物17の合成

無水酢酸 (60 ml) に酢酸ナトリウム (5 g, 69 mmol) を溶かし、加熱した後にD-ガラクトース (16) (10 g, 55 mmol) を少しずつ加える。2時間加熱還流した後TLC (トルエン:酢酸エチル=5:1) にて反応が終了したことを確認した。反応溶液を室温に戻した後に、氷水300 ccに注ぐ。ろ過して沈殿物を集める。沈殿物をエタノール (14 ml) の溶かし再結晶を行い、化合物17を9.0 g (収率41%) 得た。

【0064】

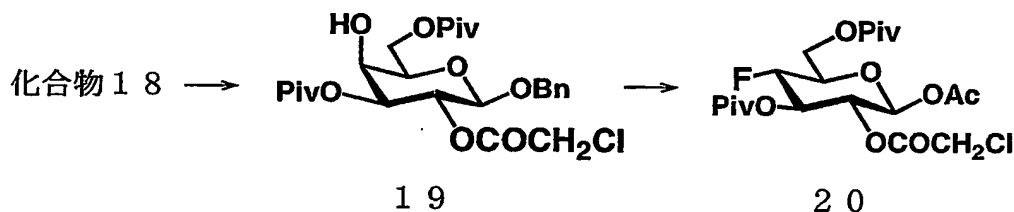
(2) 化合物18の合成

化合物17 (4.3 g, 11 mmol) を塩化メチレン (120 ml) の溶かした後、アルゴン気流下-20℃まで冷却した。続いて、反応溶液に四塩化スズ (3.1 g, 12 mmol) を加え20分攪拌した後、ベンジルアルコール (2.3 g, 22 mmol) を加え反応温度を室温に戻した。TLC (ヘキサン:酢酸エチル=1:1) で反応終了を確認後、反応溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に注ぎ、塩化メチレンで抽出した。塩化メチレン層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過、減圧濃縮した。残渣をデシケータで乾燥後、蒸留したメタノール

(80 ml) に溶かしナトリウムメトキシド (4.31 g, 5.5 mmol) を加えアルゴン気流下撹拌した。TLC (酢酸エチル：メタノール：水=10：5：1) で反応終了を確認した後、陽イオン交換樹脂 IR-120 (+) で中和し反応を終了させた。樹脂をろ過して取り除いた後、濾液を減圧濃縮した。残渣をデシケータで乾燥後、ピリジン (44 ml) に溶かし、反応溶液を 0 度に冷却した。反応溶液にトリメチルアセチルクロリド (4.6 g, 38.5 mmol) を加えた後、室温に戻しアルゴン気流下 1 時間撹拌した。反応終了を TLC (ヘキサン：酢酸エチル=2：1) で確認し 0 度に冷却後メタノールを加え反応を終了させた。反応溶液をそのまま減圧濃縮した後、残渣を酢酸エチルに溶かし飽和食塩水溶液、水で洗浄し無水硫酸マグネシウムで酢酸エチルを乾燥させた。硫酸マグネシウムをろ過して取り除いた後、濾液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒ヘキサン：酢酸エチル=2：1) で精製し化合物 18 (2.8 g, 収率 58%) を得た。

【0065】

【化38】



【0 0 6 6】

### (3) 化合物 19 の合成

化合物 18 (200 mg, 0.455 mmol) をジクロロメタン (7.8 ml) とピリジン (1.3 ml) に溶かし、無水クロロ酢酸 (155 mg, 0.91 mmol) を加えて、アルゴン気流下 -15℃ で攪拌しながら 15 分間反応させた。反応終了を確認後、メタノール (5 ml) で無水クロロ酢酸をクエンチし、トルエンで 3 回共沸しながら減圧濃縮した。残渣を酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル：ヘキサン = 1：4) で

精製し、化合物 19 (収量 172 mg, 収率 73.5%) を得た。

【0067】

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  7.37-7.29 (m, 5H, Ph), 5.39 (dd, 1H,  $J_{1,2} = 8.0 \text{ Hz}$ ,  $J_{2,3} = 10.4 \text{ Hz}$ , H-2), 4.89 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 3.4 \text{ Hz}$ , H-3), 4.89, 4.62 (2d, 2H,  $J = 12.5 \text{ Hz}$ ,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.53 (d, 1H, H-1), 4.37 (dd, 1H,  $J_{6a,6b} = 11.5 \text{ Hz}$ ,  $J_{6a,5} = 6.0 \text{ Hz}$ , H-6a), 4.32 (dd, 1H,  $J_{6b,5} = 6.6 \text{ Hz}$ , H-6b), 4.00 (m, 1H, H-4), 3.92 (s, 2H,  $\text{COCH}_2\text{Cl}$ ), 3.75 (dd, 1H, H-5), 1.23, 1.19 [2s, 18H,  $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ]

【0068】

$^{13}\text{C}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  178.33, 177.57, 165.92, ( $\text{C}=\text{O}$ ), 136.66, 128.48, 128.07, 127.89 (Ph), 99.16 (C-1), 72.82 (C-3), 72.35 (C-5), 70.92 (C-2), 70.49 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 67.29 (C-4), 62.30 (C-6), 40.40 ( $\text{COCH}_2\text{Cl}$ ), 38.95, 38.80 [ $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ], 27.14, 26.98 [ $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ]

【0069】

$^1\text{H}$ -NMR、 $^{13}\text{C}$ -NMRはBrukerのAVANCE 400 (400 MHzと表記)で測定した。溶媒が重クロロホルムの場合は内部標準としてトリメチルシランを用いた。その他の重溶媒を用いたときは溶媒ピークを基準とした。化学シフトは、 $\delta$  (ppm)で、結合定数は $J$  (Hz)示した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーには、Merck Silicagel 60, 70-230 mesh又は230-400 meshを、球状シリカゲルは関東化学社製のSilica Gel 60 (Spherical)を、反応検出用(以下TLC)としてはE. Merck社製DC-Platten Kieselgel 60 F254 (Art 1, 05715)を使用した。高速液体クロマトグラフィー

(HPLC) のカラムはナカライテスク社製 COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR Packed Column ( $\phi 4.6 \times 150$  mm), を使用し、分光蛍光光度計は、JASCO社製のFP-210 Spectrofluorometerを用いた。

#### 【0070】

##### (4) 化合物20の合成

化合物19 (300 mg, 0.583 mmol) をジクロロメタン (5.8 ml) に溶かし、アルゴン気流下 -15 °C で攪拌しながらジエチルアミノスルファートリフルオリド (DAST) を加えた。DAST を加え 10 分後室温に戻し 1 時間反応させた。TLC で原料消失を確認し、メタノール (3 ml) で DAST をクエンチ後減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:ヘキサン=1:6) で精製し化合物20 (収量 211 mg、収率 70%) を得た。

#### 【0071】

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$  7.37-7.27 (m, 5H, Ph), 5.31 (ddd, 1H, J<sub>3</sub>, F=14.3 Hz, J<sub>3,4</sub>=9.69 Hz, J<sub>2,3</sub>=9.63 Hz, H-3), 5.04 (dd, 1H, J<sub>1,2</sub>=7.93 Hz, H-2), 4.86 (d, 1H, J=12.2 Hz, OCH<sub>2</sub>Ph), 4.60 (d, 1H, H-1), 4.59 (d, 1H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4.44 (ddd, 1H, J<sub>4,5</sub>=9.04 Hz, J<sub>4</sub>, F=50.6 Hz, H-4), 4.43 (ddd, 1H, J<sub>6a,6b</sub>=12.1 Hz, J<sub>6a,5</sub>=2.41 Hz, J<sub>6a</sub>, F=2.23 Hz, H-6a), 4.24 (ddd, 1H, J<sub>6b,5</sub>=5.67 Hz, J<sub>6b</sub>, F=1.28 Hz, H-6b), 3.93 (s, 2H, OCOCH<sub>2</sub>Cl), 3.75 (m, 1H, H-5), 1.25, 1.18 [2s, 18H, OCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]

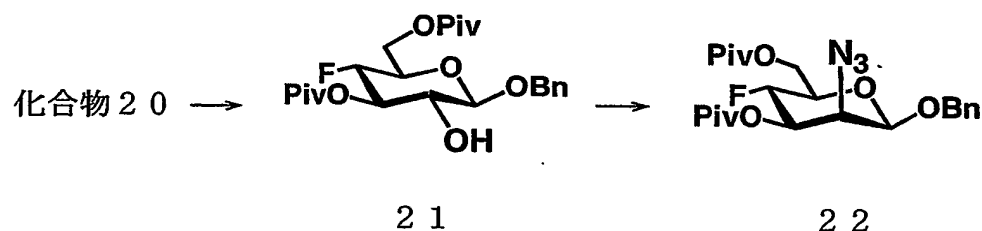
#### 【0072】

<sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$  177.94, 117.43, 165.88 (C=O), 136.34, 128.55, 138.23, 127.92 (Ph), 98.68 (C-1), 87.35 (d

【0 0 7 3】

【化 3 9】



【0 0 7 4】

### (5) 化合物 21 の合成

化合物 20 (625 mg, 1.21 mmol) をメタノール (24.2 ml) に溶かし、アルゴン気流下 -15℃ で攪拌しながら、ナトリウムメトキシド (13.1 mg, 0.6 mmol) を加えた。30 分後 TLC で原料消失を確認後陽イオン交換樹脂 IR-120 (+) で中和 (pH 6-7) し、樹脂を濾過後減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:ヘキサン=1:4) で精製し化合物 21 (収量 395 mg, 収率 74%) を得た。

【0 0 7 5】

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$  7.38-7.29 (m, 5H, Ph), 5.18 (ddd, 1H,  $J_3$ ,  $F=14.8$  Hz,  $J_{3,4}=9.51$  Hz,  $J_{2,3}=8.99$  Hz, H-3), 4.90 (d, 1H,  $J=11.7$ ,  $OCH_2Ph$ ), 4.63 (d, 1H,  $OCH_2Ph$ ), 4.47 (ddd, 1H,  $J_{5,6a}=2.43$  Hz,  $J_{6a}$ ,  $F=2.2$  Hz, H-6a), 4.47 (d, 1H,  $J_{1,2}=7.7$  Hz, H-1), 4.38 (ddd, 1H,  $J_{4,5}=8.96$  Hz,  $J_{3,4}=9.67$  Hz,  $J_4$ ,  $F=50.8$  Hz, H-4), 4.23 (ddd, 1H,  $J_{6a,6b}=12.0$  Hz

,  $J_{6b}$ ,  $5 = 6.05 \text{ Hz}$ ,  $J_{6b}$ ,  $F = 1.26 \text{ Hz}$ ,  $H-6b$ ),  $3.75$  (m, 1H,  $H-5$ ),  $3.54$  (m, 1H,  $J_2$ ,  $O_H = 2.70 \text{ Hz}$ ,  $H-2$ ),  $1.27$ ,  $1.26$  [2s, 18H,  $OCOC(CH_3)_3$ ]

## 【0076】

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $400 \text{ MHz}$ ,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$   $178.17$ ,  $177.94$  ( $\text{C=O}$ ),  $136.54$ ,  $128.54$ ,  $128.17$ ,  $128.12$  ( $\text{Ph}$ ),  $101.31$  ( $\text{C-1}$ ),  $87.45$  (d,  $J_4$ ,  $F = 187.39 \text{ Hz}$ ,  $\text{C-4}$ ),  $74.17$  (d,  $J_3$ ,  $F = 18.88 \text{ Hz}$ ,  $\text{C-3}$ ),  $72.45$  (d,  $J_2$ ,  $F = 7.56 \text{ Hz}$ ,  $\text{C-2}$ ),  $71.45$  (d,  $J_5$ ,  $F = 23.26 \text{ Hz}$ ,  $\text{C-5}$ ),  $71.09$  ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ),  $62.44$  ( $\text{C-6}$ ),  $38.90$ ,  $38.85$  [ $OCOC(CH_3)_3$ ],  $27.14$ ,  $26.99$  [ $OCOC(CH_3)_3$ ]

## 【0077】

## (6) 化合物22の合成

ピリジン ( $22.2 \mu\text{l}$ ,  $0.274 \text{ mmol}$ ) を溶かしたジクロロメタン ( $370 \mu\text{l}$ ) 溶液に0度で無水トリフルオロメタンスルホン酸 ( $46 \mu\text{l}$ ,  $0.274 \text{ mmol}$ ) を滴下し、15分後、化合物21をジクロロメタン ( $1 \text{ ml}$ ) に溶かしたものを0度で滴下した。TLCで原料消失を確認し、反応混合物をジクロロメタンで希釈した。有機層を飽和重曹水、飽和食塩水、水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後濃縮した。残渣を真空ポンプでさらに乾燥後ベンゼン ( $1 \text{ ml}$ ) に溶かし、アルゴン気流下室温でアジ化ナトリウム ( $13 \text{ mg}$ ,  $0.206 \text{ mmol}$ )、テトラアンモニウムクロライド ( $57 \text{ mg}$ ,  $0.206 \text{ mmol}$ ) を加え40度で反応させた。2時間後TLCで原料消失を確認後減圧濃縮した。残渣を酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水、水で洗浄し無水硫酸マグネシウムで乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:ヘキサン=1:4) で精製して化合物22 (収量  $30.4 \text{ mg}$ , 収率 95%) を得た。

## 【0078】

$^1\text{H-NMR}$  ( $400 \text{ MHz}$ ,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  7.39–7.32 (m, 5H, Ph), 4.99 (ddd, 1H,  $J_{3,4}=9.27\text{ Hz}$ ,  $J_{2,3}=3.87\text{ Hz}$ , H-3), 4.93 (d, 1H,  $J=12.07\text{ Hz}$ ,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.67 (d, 1H,  $J_{1,2}=1.18\text{ Hz}$ , H-1), 4.63 (d, 1H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.51 (ddd, 1H,  $J_{6a,6b}=11.95\text{ Hz}$ ,  $J_{6a,5}=2.54\text{ Hz}$ ,  $J_{6a,F}=2.08\text{ Hz}$ , H-6a), 4.23 (ddd, 1H,  $J_{6b,5}=6.14\text{ Hz}$ ,  $J_{6b,F}=1.14\text{ Hz}$ , H-6b), 4.08 (m, 1H, H-2), 3.64 (m, 1H, H-5), 1.26 [2s, 18H,  $\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$ ]

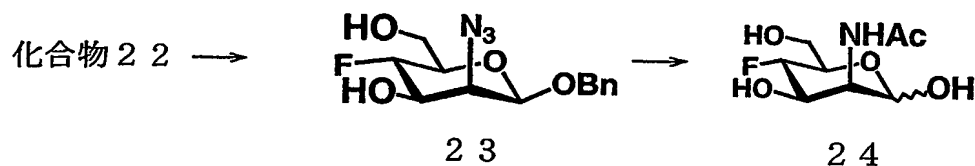
## 【0079】

$^{13}\text{C}$ -NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  178.01, 177.68 (C=O), 136.06, 128.63, 128.31, 128.14 (Ph), 97.25 (C-1), 85.51 (d,  $J_4$ ,  $F=183.97$ , C-4), 72.01 (d,  $J_5$ ,  $F=23.89$ , C-5), 71.73 (d,  $J_3$ ,  $F=18.98$ , C-3), 70.57 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 62.42 (C-2, C-6), 39.08, 38.90 [ $\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$ ], 27.18, 26.95 [ $\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$ ]

## 【0080】

【化40】



## 【0081】

(7) 化合物 23 の合成

化合物 22 (180mg, 0.387mmol) をメタノール (8ml) に溶かしナトリウムメトキシド (922mg, 9.67mmol) を加え攪拌し 40℃で反応させた。4.5時間後 TLC で 1 スポット にまとまったことを確認し陽

イオン交換樹脂 IR-120 (+) で中和後、濾過し濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:ヘキサン=1:1) で精製し化合物 23 (収量 105.3 mg, 収率 91.6%) を得た。

【0082】

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  
 $\delta$  7.40–7.31 (m, 5H, Ph), 4.96 (d, 1H,  $J=12.13$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.71 (d, 1H,  $J_{1,2}=1.33$  Hz, H-1), 4.69 (d, 1H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.49 (ddd, 1H,  $J_4$ ,  $F=51.06$  Hz,  $J_{4,5}=9.19$  Hz,  $J_{3,4}=9.20$  Hz, H-4), 4.02 (m, 1H, H-2), 3.93 (dddd, 1H,  $J_{6a,6b}=12.19$  Hz,  $J_{6a,5}=2.31$  Hz,  $J_{6a}$ ,  $F=2.32$  Hz,  $J_{6a}$ , OH=6.20 Hz, H-6a), 3.89–3.77 (m, 2H, H-3, H-6b), 3.39 (m, 1H, H-5),

【0083】

$^{13}\text{C-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  
 $\delta$  136.39, 128.62, 128.24, 127.83 (Ph), 98.63 (C-1), 88.19 (d,  $J_4$ ,  $F=178.91$  Hz, C-4), 73.95 (d,  $J_5$ ,  $F=25.48$  Hz, C-5), 71.18 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 71.16 (d,  $J_3$ ,  $F=19.69$  Hz, C-3), 64.48 (d,  $J_2$ ,  $F=8.42$  Hz, C-2), 61.39 (C-6)

【0084】

(8) 化合物 24 の合成

化合物 23 (105 mg, 0.353 mmol) をメタノール (7 ml) に溶かし無水酢酸 (333  $\mu\text{l}$ , 3.53 mmol) を加えた後、アルゴン気流下で触媒量の 10% Pd/C を加え水素置換してから室温で攪拌した。2 時間後 TLC で原料消失を確認し、活性炭濾過後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:メタノール=5:1) で精製し化合物 24 (収量 57 mg, 収率 72%) を得た。

【0085】



$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),

$\delta$  5.23 (dd, 1H,  $J_{1,2}=2.69\text{Hz}$ ,  $J_{1,\text{F}}=1.44\text{Hz}$ , H-1- $\alpha$ ), 4.65 (ddd, 1H,  $J_{4,\text{F}}=50.94\text{Hz}$ ,  $J_{3,4}=9.06\text{Hz}$ ,  $J_{4,5}=9.58\text{Hz}$ , H-4- $\alpha$ ), 4.47 (m, 1H, H-2- $\alpha$ ), 4.43 (ddd, 1H,  $J_{3,\text{F}}=14.28\text{Hz}$ ,  $J_{2,3}=4.9\text{Hz}$ , H-3- $\alpha$ ), 4.16 (m, 1H, H-5- $\alpha$ ), 3.95 (m, 2H, H-6a- $\alpha$ , H-6b- $\alpha$ ), 2.14 (s, 3H,  $\text{NHCOCH}_3$ - $\alpha$ )

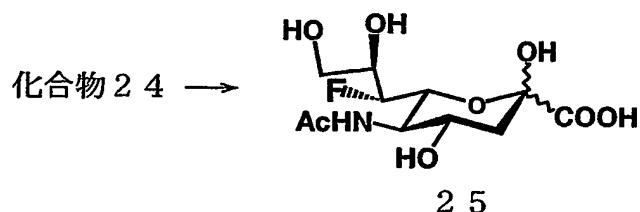
【0086】

$^{13}\text{C-NMR}$  (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),

$\delta$  175.27 ( $\text{C=O-}\alpha$ ), 93.46 ( $\text{C-1-}\alpha$ ), 88.30 (d,  $J_{4,\text{F}}=177.00\text{Hz}$ ,  $\text{C-4-}\alpha$ ), 69.91 (d,  $J_{5,\text{F}}=24.41\text{Hz}$ ,  $\text{C-5-}\alpha$ ), 67.60 (d,  $J_{3,\text{F}}=18.74\text{Hz}$ ,  $\text{C-3-}\alpha$ ), 60.36 ( $\text{C-6}$ ), 54.12 (d,  $J_{2,\text{F}}=8.68\text{Hz}$ ,  $\text{C-2-}\alpha$ ), 22.31 ( $\text{NHCOCH}_3$ - $\alpha$ )

【0087】

【化41】



【0088】

(9) 化合物25の合成

化合物24 (50mg, 0.224mmol) ピルビン酸ナトリウム (123mg, 1.12mmol) と牛血清アルブミン (5mg) をリン酸ナトリウム緩衝溶液 (100mM, pH7.5, 3.4ml) に溶かし、その後シアル酸アルドラーゼ (50U) を加え室温で反応を開始した。24時間後反応溶液を凍結乾燥させ、少量の水に溶かし陰イオン交換樹脂カラム (AG 1-X8, 200-400mesh, format form) にのせた。水300ml流した後、

1 Mギ酸で目的物を溶出させ減圧濃縮し、ゲル濾過カラム (Sephadex G-15, 水) で精製し化合物 25 (収量 40 mg, 収率 58.9%) を得た。

## 【0089】

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),

$\delta$  4.61 (dd, 1H,  $J_{7,8}=8.97\text{ Hz}$ ,  $J_{7,\text{F}}=45.56\text{ Hz}$ , H-7), 4.18 (dd, 1H,  $J_{5,6}=10.63\text{ Hz}$ ,  $J_6, \text{F}=29.86\text{ Hz}$ , H-6), 4.15 (m, 1H, H-4), 4.07 (m, 1H, H-8), 4.02 (dd, 1H,  $J_{4,5}=10.10\text{ Hz}$ , H-5), 3.90 (ddd, 1H,  $J_{9a,9b}=12.18\text{ Hz}$ ,  $J_{9a,8}=2.77\text{ Hz}$ ,  $J_{9a,\text{F}}=2.86\text{ Hz}$ , H-9a), 3.76 (ddd, 1H,  $J_{9b,8}=5.33\text{ Hz}$ ,  $J_{9b,\text{F}}=2.06\text{ Hz}$ , H-9b), 2.40 (dd, 1H,  $J_{3\text{eq},3\text{ax}}=13.00$ ,  $J_{3\text{eq},4}=4.88\text{ Hz}$ , H-3eq), 2.15 (s, 3H,  $\text{OCOCH}_3$ ), 2.00 (dd, 1H,  $J_{3\text{ax},4}=11.70\text{ Hz}$ , H-3ax),

## 【0090】

$^{13}\text{C-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),

$\delta$  175.17, 173.68 (C=O), 96.01 (C-1), 89.12 (d,  $J_{7,\text{F}}=179.23\text{ Hz}$ , C-7), 69.67 (d,  $J_6, \text{F}=17.41\text{ Hz}$ , C-6), 68.31 (d,  $J_8, \text{F}=26.50\text{ Hz}$ , C-8), 67.26 (C-4), 62.70 (C-6), 52.17 (C-5), 39.19 (C-3), 22.61 ( $\text{NHCOCH}_3$ ),

## 【0091】

参考例 5 (5-アセタミド-3,5,8-トリデオキシ-8-フルオロ-D-グリセロ- $\beta$ -D-ラクト-2-ノヌロピラノシドニック アシッド (8-フルオロシアル酸))

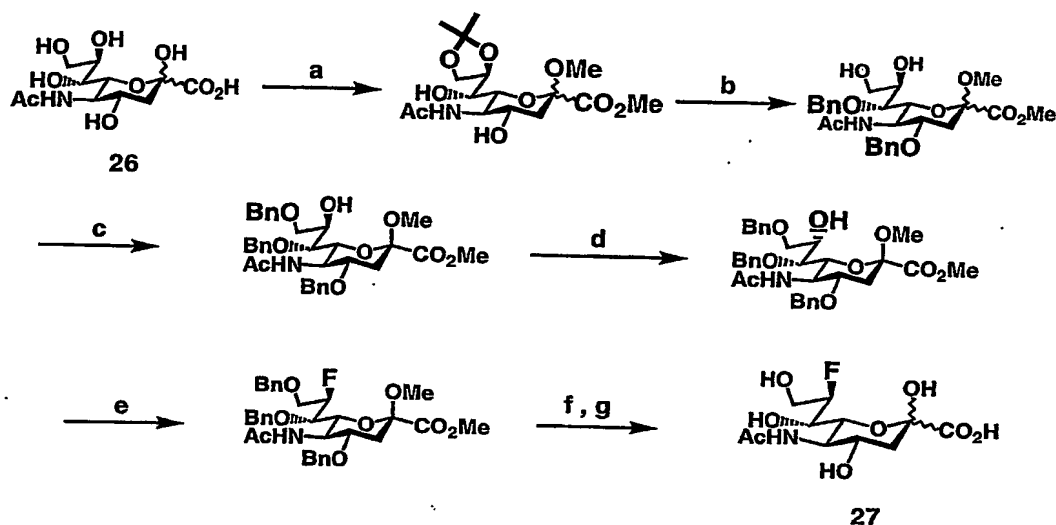
5-Acetamide-3,5,8-trideoxy-8-fluoro-D-glycero- $\beta$ -D-galacto-2-nonulopyranosidonic acid 27 の合成)

下記のスキームに従ってシアル酸 (26) から 5-アセタミド-3,5,8-トリ

リデオキシ-8-フルオロ-D-グリセロ-β-D-ラクト-2-ノヌロピラノシドニック アシッド (27) を合成した。

【0092】

【化42】



【0093】

8-フルオロシアル酸のNMRデータを以下に示す。

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O),

δ 4.69 (dddd, 1H, J<sub>8</sub>, F=48.7Hz, J<sub>8, 9a</sub>=5.0Hz, J<sub>8, 9b</sub>=3.5Hz, H-8), 4.03 (ddd, 1H, J<sub>4, 5</sub>=10.0Hz, J<sub>3ax, 4</sub>=11.1Hz, J<sub>3eq, 4</sub>=4.7Hz, H-4), 3.95 (dd, 1H, J<sub>4, 5</sub>=10.0Hz, J<sub>5, 6</sub>=9.9Hz, H-5), 3.94 (ddd, 1H, J<sub>6, 7</sub>=~0Hz, J<sub>7, 8</sub>=6.8Hz, J<sub>7, F</sub>=14.0Hz, H-7), 3.88 (ddd, 1H, J<sub>9a, 9b</sub>=13.3Hz, J<sub>9a, 8</sub>=3.5Hz, J<sub>9b, F</sub>=28.0Hz, H-9b), 3.86 (dd, 1H, J<sub>5, 6</sub>=9.9Hz, J<sub>6, 7</sub>=~0Hz, H-6), 3.72 (ddd, 1H, J<sub>9a, 9b</sub>=5.33Hz, J<sub>9a, 8</sub>=5.0Hz, J<sub>9a, F</sub>=30.6Hz, H-9a), 2.28 (dd, 1H, J<sub>3eq, 3ax</sub>=13.00, J<sub>3eq, 4</sub>=4.6Hz, H-3eq), 2.05 (s, 3H, Ac), 1.87 (dd, 1H, J<sub>3ax, 4</sub>=11.1Hz, J<sub>3eq, 3ax</sub>=13.00, H-3ax)

## 【0094】

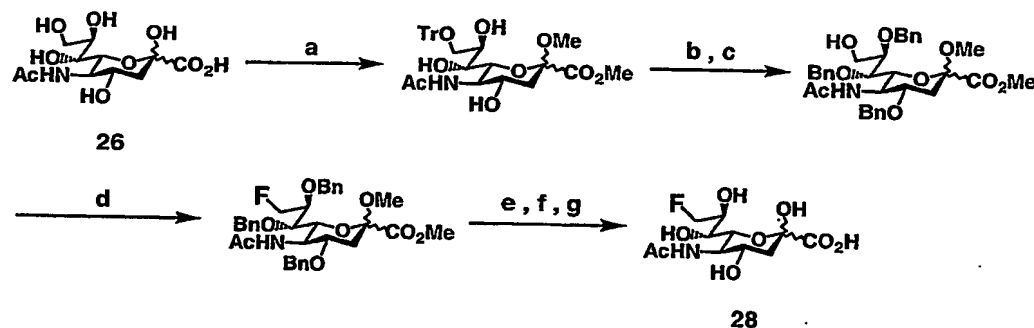
参考例6 (5-アセタミド-3,5,9-トリデオキシ-9-フルオロ-D-グリセローβ-D-ラクト-2-ノヌロピラノシドニック アシッド (9-フルオロシアル酸)

5-Acetamide-3,5,9-trideoxy-9-fluoro-D-glycero-β-D-galacto-2-nonulopyranosidonic acid 28の合成)

下記のスキームに従ってシアル酸(26)から5-アセタミド-3,5,9-トリデオキシ-9-フルオロ-D-グリセローβ-D-ラクト-2-ノヌロピラノシドニック アシッド(28)を合成した。

## 【0095】

## 【化43】

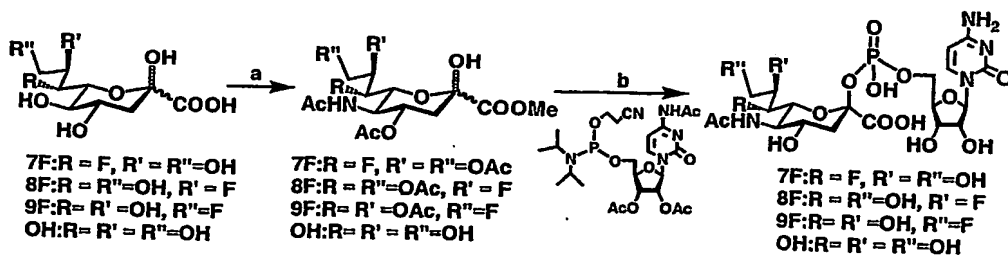


## 【0096】

参考例7 CMP-シアル酸の合成

## 【0097】

## 【化44】



## 【0098】

(a) (1) Dowex 50-X8, MeOH, (2) Ac<sub>2</sub>O, 60% HCl

10<sub>4</sub>;

(b) (1) 1H-Tetrazole, CH<sub>3</sub>CN, (2) t-BuOOH, CH<sub>3</sub>CN, (3) DBU, CH<sub>3</sub>CN, (4) NaOMe, MeOH, H<sub>2</sub>O

【0099】

シアル酸 (0.074 mmol) を蒸留メタノール (3 ml) に溶かし、アルゴン気流下室温で攪拌しながらDowex-50W-X8 (65 mg) を加え、3時間反応させた。反応終了を確認し、濾過後減圧濃縮した。残渣を無水酢酸 (200  $\mu$ l) に溶かし、-20℃で攪拌しながら無水酢酸:60%過塩素酸=15:1溶液 (22  $\mu$ l) を加え、10℃にて40分反応させた。反応終了を確認後、反応溶液を酢酸エチルで希釈して、飽和重曹水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後減圧濃縮して、カルボキシル基が保護されたシアル酸 (29) を含む残渣を得た。残渣とCMP-5'-ホスホロアミダイト誘導体 (30) (0.23 mmol) をベンゼンで別々の3回共沸し、蒸留したアセトニトリル (100  $\mu$ l) にそれぞれ溶かし混ぜた。アルゴン気流下氷水中で攪拌しながら1H-テトラゾール (17 mg, 0.23 mmol) を加えた。5分後に室温に戻し、さらに10分間反応させた。反応終了を確認後、溶液を酢酸エチルで希釈し、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後30℃以下で濃縮した後さらにトルエンで2回共沸し水を取り除いた。残渣に蒸留したアセトニトリル (400  $\mu$ l) を加え、アルゴン気流下氷冷しながら2.5Mのt-BuOOHトルエン溶液 (290  $\mu$ l) を滴下した。5分後に室温に戻し、さらに20分間攪拌した。反応終了を確認後、ジメチルスルフィド (53  $\mu$ l) を滴下し10分間攪拌してt-BuOOHをクエンチした。その後、DBU (18  $\mu$ l) を滴下して20分間室温で攪拌した。反応終了を確認後、メタノール (0.67 ml)、水 (1.35 ml)、ナトリウムメトキシド (360 mg) を加え室温で16時間反応させた。反応終了を確認後水で抽出し、ジクロロメタンで洗浄した。水層を25℃以下で8 ml程度まで減圧濃縮した。この水溶液をSephadex G-15 (1.8  $\phi$  × 90 cm) を用いるゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: 20 mMアンモニア水、流速: 0.3 ml/min) で精製し、CMP-シアル酸 (31) を得た。

## 【0100】

## 参考例8 CMP-7''-デオキシ-7''-フルオロ-シアル酸の合成

シアル酸の代わりに化合物(25)を用いた以外は参考例7と同様にしてCMP-7''-デオキシ-7''-フルオロ-シアル酸を合成した。NMRデータを以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz, 50mM  $\text{ND}_4\text{DCO}_3$  in  $\text{D}_2\text{O}$ ),  
 $\delta$  8.04 (d, 1H,  $J_{5,6}=7.6\text{Hz}$ , H-6), 6.20 (d, 1H,  $J_{6,5}=7.6\text{Hz}$ , H-5), 6.06 (d, 1H,  $J_{1',2'}=4.5\text{Hz}$ , H-1'), 4.54 (dd, 1H,  $J_{7'',8''}=9.5\text{Hz}$ ,  $J_{7'',F}=45.9\text{Hz}$ , H-7''), 4.42~4.20 (m, 7H, H-2', H-3', H-4', H-5' a, H-5' b, H-6'', H-8''), 4.16 (ddd, 1H,  $J_{4'',3''\text{eq}}=4.7\text{Hz}$ ,  $J_{4'',3''\text{ax}}=11.3\text{Hz}$ ,  $J_{4,5}=10.3\text{Hz}$ , H-4''), 4.03 (dd, 1H,  $J_{5'',4''}=J_{5'',6''}=10.3\text{Hz}$ , H-5''), 3.91 (ddd, 1H,  $J_{9''\text{a},9''\text{b}}=12.2\text{Hz}$ ,  $J_{9''\text{a},8''}=2.8\text{Hz}$ ,  $J_{9''\text{a},F}=2.8\text{Hz}$ , H-9'' a), 3.75 (ddd, 1H,  $J_{9''\text{a},9''\text{b}}=12.2\text{Hz}$ ,  $J_{9''\text{b},8''}=5.4\text{Hz}$ ,  $J_{9''\text{b},F}=2.1\text{Hz}$ , H-9'' b), 2.61 (dd, 1H,  $J_{3''\text{eq},4''}=4.7\text{Hz}$ ,  $J_{\text{gem}}=13.3\text{Hz}$ , H-3'' eq), 2.14 (s, 3H, Ac), 1.76 (ddd, 1H,  $J_{3''\text{ax},4''}=11.5\text{Hz}$ ,  $J_{\text{gem}}=13.3\text{Hz}$ ,  $J_{3''\text{ax},P}=5.6\text{Hz}$ , H-3'' ax),

## 【0101】

## 参考例9 CMP-8''-デオキシ-8''-フルオロ-シアル酸の合成

シアル酸の代わりに化合物(27)を用いた以外は参考例7と同様にしてCMP-8''-デオキシ-8''-フルオロ-シアル酸を合成した。NMRデータを以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz, 50mM  $\text{ND}_4\text{DCO}_3$  in  $\text{D}_2\text{O}$ ),  
 $\delta$  8.08 (d, 1H,  $J_{5,6}=7.6\text{Hz}$ , H-6), 6.20 (d, 1H,  $J_{6,5}=7.6\text{Hz}$ , H-5), 6.09 (d, 1H,  $J_{1',2'}=4.1$

Hz, H-1' ), 4.90 (m, 1H, H-8" ), 4.42 (dd, 1H, J<sub>3', 2'</sub> = J<sub>3', 4'</sub> = 4.9 Hz, H-3' ), 4.39 (dd, 1H, J<sub>2', 1'</sub> = 4.1 Hz, J<sub>2', 3'</sub> = 4.9 Hz, H-2' ), 4.31-4.28 (m, 3H, H-4', H-5' a, H-5' b), 4.15 (ddd, 1H, J<sub>4", 3"</sub> e<sub>q</sub> = 4.4 Hz, J<sub>4", 3"</sub> a<sub>x</sub> = 11.5 Hz, J<sub>4, 5</sub> = 10.5 Hz, H-4" ), 4.10-3.90 (m, 5H, H-5", H-6", H-7", H-9" a, H-9" b), 2.60 (dd, 1H, J<sub>3" e<sub>q</sub>, 4"</sub> = 4.4 Hz, J<sub>gem</sub> = 13.1 Hz, H-3" e<sub>q</sub>), 2.13 (s, 3H, Ac), 1.77 (ddd, 1H, J<sub>3" a<sub>x</sub>, 4"</sub> = 11.5 Hz, J<sub>gem</sub> = 13.1 Hz, J<sub>3" a<sub>x</sub>, p</sub> = 4.5 Hz, H-3" a<sub>x</sub>),

### 【0102】

参考例10 CMP-9" -デオキシ-9" -フルオロ-シアル酸の合成

シアル酸の代わりに化合物(28)を用いた以外は参考例7と同様にしてCMP-9" -デオキシ-9" -フルオロ-シアル酸を合成した。

### 【0103】

実施例1 Fmoc基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジシアロ $\alpha$ 2, 3糖鎖アスパラギン(C1-1)およびFmoc基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護した2種のモノシアロ $\alpha$ 2, 3糖鎖アスパラギン(C1-2及びC1-3)の合成

参考例3で得られたFmoc基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したアシアロ糖鎖アスパラギンにシアル酸転移酵素を用いてCMP-シアル酸を転移させた。

シアル酸転移酵素として $\alpha$ 2, 3転移酵素である市販のRat, Recombinant由来のものを用いた。

参考例3で得られたアシアロ9糖(20mg, 10.1  $\mu$ mol)を50mM カコジル酸緩衝液(pH=6.0, 5ml)に溶解させた後、牛血清アルブミン(BSA, 5mg)を加える。これに、CMP-シアル酸(26mg, 40.4  $\mu$ mol)、Alkaline phosphatase (5  $\mu$ l, 125 unit)を加え均一化する。最後に、 $\alpha$ 2, 3-Sialyltransferase

se (CALBIOCHEM社製、 $100\mu\text{l}$ ) を加え  $37^{\circ}\text{C}$  で48時間静置させる。HPLCで反応をモニターしながら原料が目的量まで減少した時点で反応を終了させ、反応液をメンブランフィルターにて濾過する。濾液を濃縮し液量を減じた後、HPLC分取カラムにて精製した (YMC-Pack R&D ODS, D-ODS-5-A,  $20\times 250\text{mm}$ , AN/ $25\text{mM}$  AcONH<sub>4</sub> buffer= $18/82$ ,  $7.5\text{ml/min.}$ , wave length;  $274\text{nm}$ ) ところ、25分後にジシアロ11糖化合物 (C1-1) が、それぞれ30分後、34分後に各モノシアロ10糖化合物 (C1-2) 及び (C1-3) が溶出してきた。それぞれを分取した後、脱塩処理、次いで凍結乾燥を行うと、各化合物1、2、3がそれぞれ  $0.7\text{mg}$  ( $2.7\%$ )、 $1.9\text{mg}$  ( $8.3\%$ )、 $3.5\text{mg}$  ( $15.3\%$ ) 得られた。各化合物のNMRデータは以下のとおりである。

## 【0104】

化合物 (C1-1)

$^1\text{H}$  NMR ( $400\text{MHz}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{HOD}=4.81$ )  
 $\delta$  7.90 (d, 2H, Fmoc), 7.69 (d, 2H, Fmoc), 7.49 (dd, 2H, Fmoc), 7.42 (dd, 2H, Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man4-H1), 4.97 (d, 1H, GlcNAc1-H1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.50-4.60 (m, 4H), 4.34 (1H, Fmoc), 4.24 (bs, 1H, Man3-H2), 4.18 (bs, 1H, Man4-H2), 4.10 (m, 2H), 2.74 (m, 3H, Asn- $\beta$ CH, NeuAc7, 7'-H3eq), 2.40-2.60 (m, 1H, Asn- $\beta$ CH), 2.05, 2.03, 2.02 (each s, Ac), 1.77 (dd, 2H, NeuAc7, 7'-H3ax).

## 【0105】

化合物 (C1-2)

$^1\text{H}$  NMR ( $400\text{MHz}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{HOD}=4.81$ )  
 $\delta$  7.90 (d, 2H, Fmoc), 7.69 (d, 2H, Fmoc), 7.49 (dd, 2H, Fmoc), 7.42 (dd, 2H, Fmoc), 5.10 (s



, 1H, Man4-H1), 4.97 (d, 1H, GlcNAc1-H1), 4.90 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.47-4.60 (m), 4.43 (d, 1H), 4.32 (1H, Fmoc), 4.22 (bs, 2H), 4.17 (bs, 1H, Man4-H2), 4.06-4.13 (m, 2H), 2.72 (m, 2H, Asn-βCH, NeuAc7-H3eq), 2.50-2.60 (m, 1H, Asn-βCH), 2.05, 2.03, 2.01 (each s, Ac), 1.77 (dd, 1H, NeuAc7-H3ax).

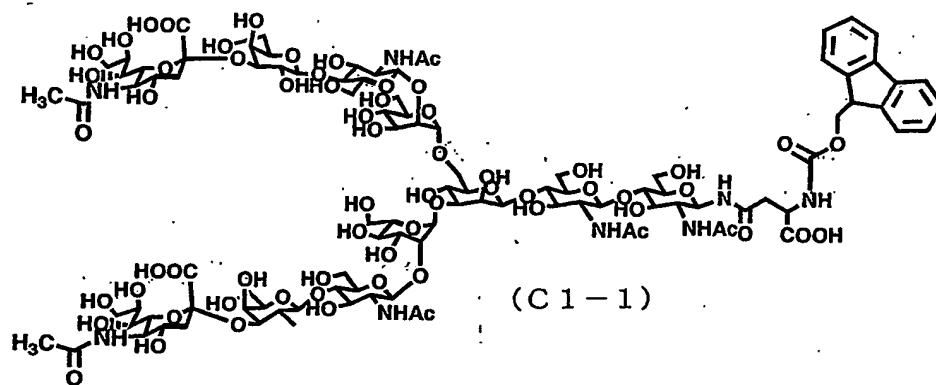
## 【0106】

化合物 (C1-3)

1H NMR (400MHz, D2O, 30℃, HOD=4.81)  
 $\delta$  7.90 (d, 2H, Fmoc), 7.69 (d, 2H, Fmoc), 7.49 (dd, 2H, Fmoc), 7.42 (dd, 2H, Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man4-H1), 4.97 (d, 1H, GlcNAc1-H1), 4.90 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.50-4.60 (m), 4.45 (d, 1H), 4.33 (1H, Fmoc), 4.22 (m, 2H), 4.17 (bs, 1H, Man4-H2), 4.09 (m, 2H), 2.74 (m, 2H, Asn-βCH, NeuAc7-H3eq), 2.45-2.60 (m, 1H, Asn-βCH), 2.05, 2.03, 2.02, 2.00 (each s, Ac), 1.77 (dd, 1H, NeuAc7-H3ax)

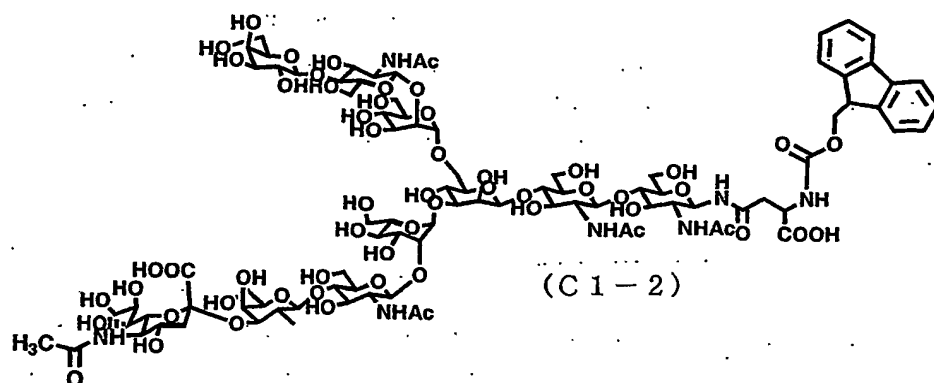
## 【0107】

【化45】



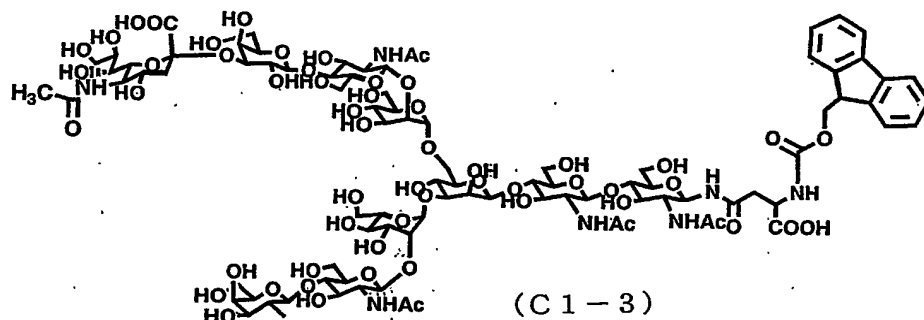
## 【0108】

## 【化46】



【0109】

## 【化47】



【0110】

## 実施例2

実施例1で得られた化合物 (C1-2) (2mg, 0.88  $\mu\text{mol}$ ) とウシ血清アルブミン1mgをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH5.0) 100  $\mu\text{l}$  に溶解させ、さらに $\beta$ -ガラクトシダーゼ (生化学工業社製、from Jack Beans, 5  $\mu\text{L}$ , 100mU) を加えた。この溶液を37℃で15時間静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。ろ液をHPLC (ODSカラム、2.0  $\phi$   $\times$  25cm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=82：18、流速7.5ml/min) で精製した後、溶媒を濃縮、次いで凍結乾燥を行った。残留物を水200  $\mu\text{l}$  に溶解させODS-カラムクロマトグラフィー (コスモシル75C18-open、最初に水で洗浄を行い、次いで25%アセトニトリル水溶液で溶出させる) を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物 (C2) が0.5  $\mu\text{g}$  得られた。NMRデータは以下

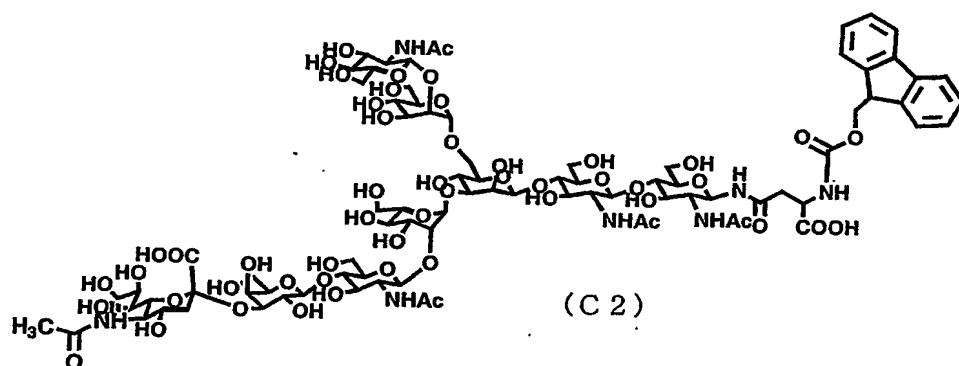
のとおりである。

【0111】

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ ,  $\text{HOD}=4.81$ )  
 $\delta$  7.90 (d, 2H, Fmoc), 7.69 (d, 2H, Fmoc), 7.49 (dd, 2H, Fmoc), 7.42 (dd, 2H, Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man4-H1), 4.98 (d, 1H, GlcNAc1-H1), 4.90 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.50-4.60 (m), 4.33 (1H, Fmoc), 4.22 (m, 2H), 4.17 (bs, 1H, Man4-H2), 4.10 (m, 2H), 2.74 (m, 2H, Asn- $\beta$ CH, NeuAc7-H3eq), 2.45-2.60 (m, 1H, Asn- $\beta$ CH), 2.05, 2.03, 2.01 (each s, Ac), 1.78 (dd, 1H, NeuAc7-H3ax)

【0112】

【化48】



【0113】

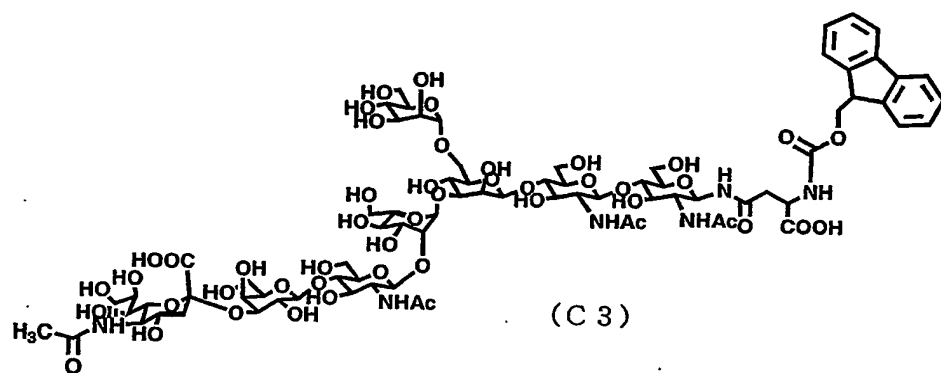
実施例3

実施例2で得られた化合物(C2) (1.8mg,  $0.86\mu\text{mol}$ )を、ウシ血清アルブミン1mgと共にHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0)  $90\mu\text{l}$ に溶解させ、さらにN-アセチル- $\beta$ -グルコサミニダーゼ(シグマアルドリッチ社製、from Jack Beans)を $4\mu\text{l}$  (250mU)加えた。この溶液を $37^\circ\text{C}$ で24時間静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。ろ液をHPLC(ODSカラム、 $2.0\phi\times 25\text{cm}$ 、展開溶媒は50mM

酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル＝82：18、流速7.5 ml/min) で精製した後、溶媒を濃縮、次いで凍結乾燥を行った。残留物を水200  $\mu$  lに溶解させODS-カラムクロマトグラフィー (コスモシル75C18-opn、最初に水で洗浄を行い、次いで25%アセトニトリル水溶液で溶出させる) を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物 (C3) が0.9  $\mu$  g得られた。

【0114】

【化49】



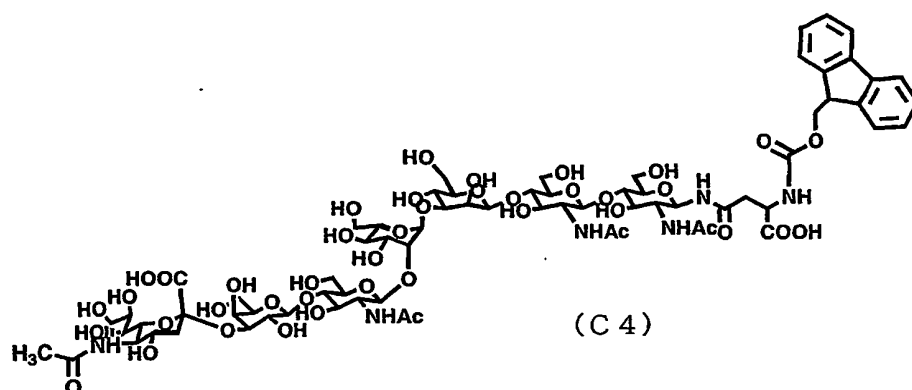
【0115】

#### 実施例4

実施例3で得られた化合物 (C3) (0.8 mg, 0.42  $\mu$ mol) とウシ血清アルブミン1 mgをHEPES緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0) 50  $\mu$  lに溶解させ、 $\alpha$ -マンノシダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from Jack Beans) 30  $\mu$  l (2.9 U) 加えた。この溶液を37℃で63時間静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。ろ液をHPLC (ODSカラム、2.0  $\phi$  × 25 cm、展開溶媒は50 mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル＝80：20、流速7.5 ml/min) で精製した後、溶媒を濃縮、次いで凍結乾燥を行った。残留物を水200  $\mu$  lに溶解させODS-カラムクロマトグラフィー (コスモシル75C18-opn、最初に水で洗浄を行い、次いで25%アセトニトリル水溶液で溶出させる) を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物 (C4) が0.6  $\mu$  g得られた。

【0116】

【化50】



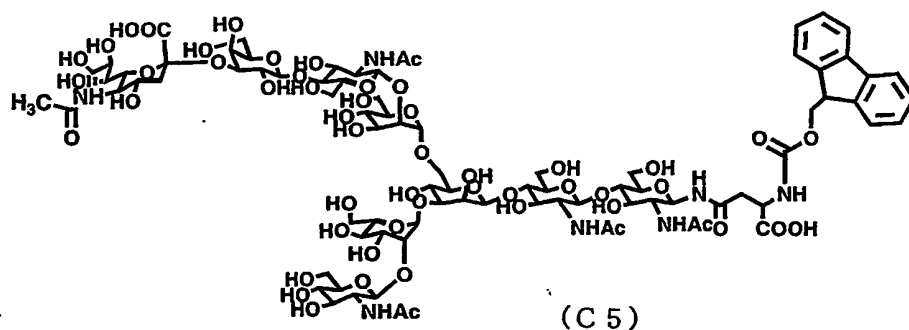
【0117】

## 実施例 5

実施例1で得られた化合物 (C1-3) (1mg, 0.44  $\mu$ mol) とウシ血清アルブミン 1mg を HEPES 緩衝溶液 (50mM, pH 5.0) 50  $\mu$ l に溶解させ、さらに  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (生化学工業社製、from Jack Beans, 5  $\mu$ L, 100mU) を加えた。この溶液を 37℃ で 15 時間静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。ろ液を HPLC (ODS カラム、2.0  $\phi$   $\times$  25cm、展開溶媒は 50mM 酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル = 82 : 18、流速 7.5 ml/min) で精製した後、溶媒を濃縮、次いで凍結乾燥を行った。残留物を水 200  $\mu$ l に溶解させ ODS-カラムクロマトグラフィー (コスモシル 75C18-open、最初に水で洗浄を行い、次いで 25% アセトニトリル水溶液で溶出させる) を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物 (C5) が 0.3  $\mu$ g 得られた。

【0118】

【化51】



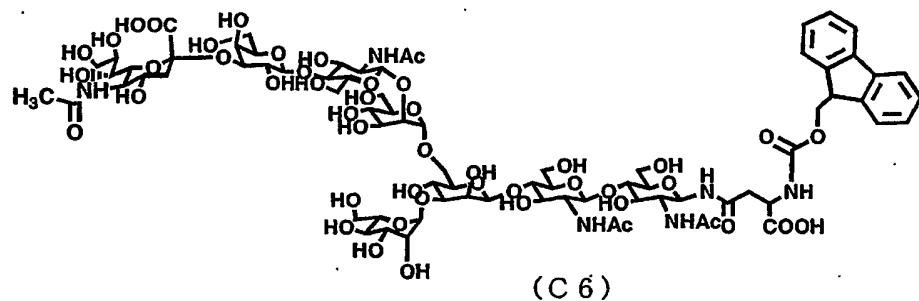
## 【0119】

## 実施例 6

実施例 5 で得られた化合物 (C5) ( $1.0\text{ mg}$ ,  $0.48\text{ }\mu\text{mol}$ ) を、ウシ血清アルブミン  $1\text{ mg}$  と共に HEPES 緩衝溶液 ( $50\text{ mM}$ ,  $\text{pH } 5.0$ )  $50\text{ }\mu\text{l}$  に溶解させ、さらに N-アセチル- $\beta$ -グルコサミニダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from Jack Beans) を  $4\text{ }\mu\text{l}$  ( $250\text{ mU}$ ) 加えた。この溶液を  $37^\circ\text{C}$  で  $22$  時間静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。ろ液を HPLC (ODS カラム、 $2.0\text{ }\phi\times 25\text{ cm}$ 、展開溶媒は  $50\text{ mM}$  酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル =  $82:18$ 、流速  $7.5\text{ ml/min}$ ) で精製した後、溶媒を濃縮、次いで凍結乾燥を行った。残留物を水  $200\text{ }\mu\text{l}$  に溶解させ ODS-カラムクロマトグラフィー (コスモシル 75 C18- $\text{opn}$ 、最初に水で洗浄を行い、次いで  $25\%$  アセトニトリル水溶液で溶出させる) を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物 (C6) が  $0.6\text{ }\mu\text{g}$  得られた。

## 【0120】

## 【化 5 2】



## 【0121】

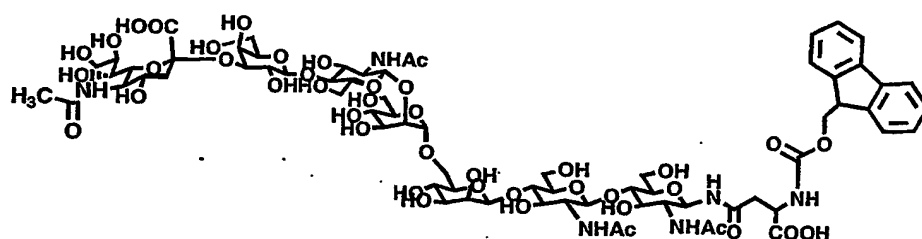
## 実施例 7

実施例 6 で得られた化合物 (C6) ( $1.0\text{ mg}$ ,  $0.53\text{ }\mu\text{mol}$ ) とウシ血清アルブミン  $1\text{ mg}$  を HEPES 緩衝溶液 ( $50\text{ mM}$ ,  $\text{pH } 5.0$ )  $50\text{ }\mu\text{l}$  に溶解させ、 $\alpha$ -マンノシダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from Jack Beans)  $10\text{ }\mu\text{l}$  ( $0.9\text{ U}$ ) 加えた。この溶液を  $37^\circ\text{C}$  で  $20$  時間静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。ろ液を HPLC (ODS カラム

、2.0  $\phi$   $\times$  25 cm、展開溶媒は50 mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル＝80：20、流速7.5 ml/min) で精製した後、溶媒を濃縮、次いで凍結乾燥を行った。残留物を水200  $\mu$  lに溶解させODS-カラムクロマトグラフィー (コスモシル75 C18-opn、最初に水で洗浄を行い、次いで25%アセトニトリル水溶液で溶出させる) を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物 (C7) が0.5  $\mu$  g得られた。

【0122】

【化53】



(C7)

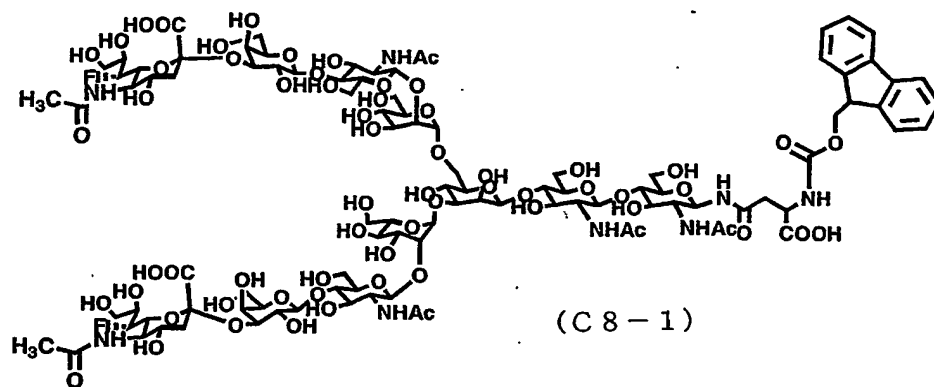
【0123】

実施例8 Fmoc基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジ7''-デオキシ-7''-フルオロ-シアロ $\alpha$ 2,3糖鎖アスパラギン (C8-1) およびFmoc基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護した2種のモノ7''-デオキシ-7''-フルオロ-シアロ $\alpha$ 2,3糖鎖アスパラギン (C8-2及びC8-3) の合成

参考例8で得られたCMP-7''-デオキシ-7''-フルオロ-シアル酸を用いた以外は実施例1と同様にして下記に示すFmoc基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジ7''-デオキシ-7''-フルオロ-シアロ $\alpha$ 2,3糖鎖アスパラギンおよびFmoc基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護した2種のモノ7''-デオキシ-7''-フルオロ-シアロ $\alpha$ 2,3糖鎖アスパラギンを得た。

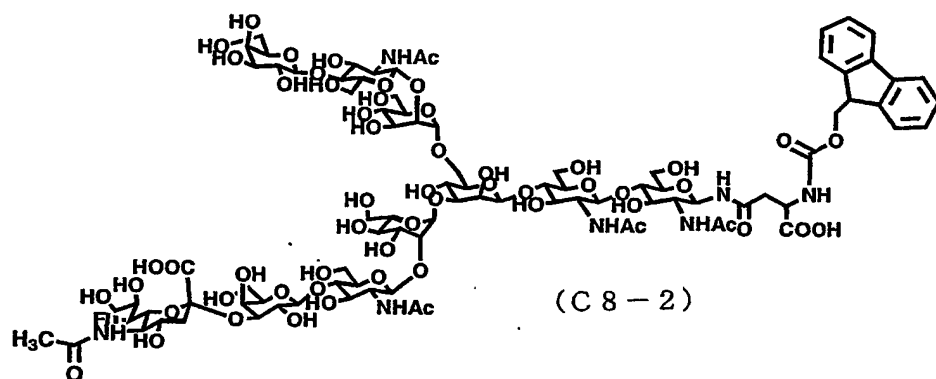
【0124】

【化54】



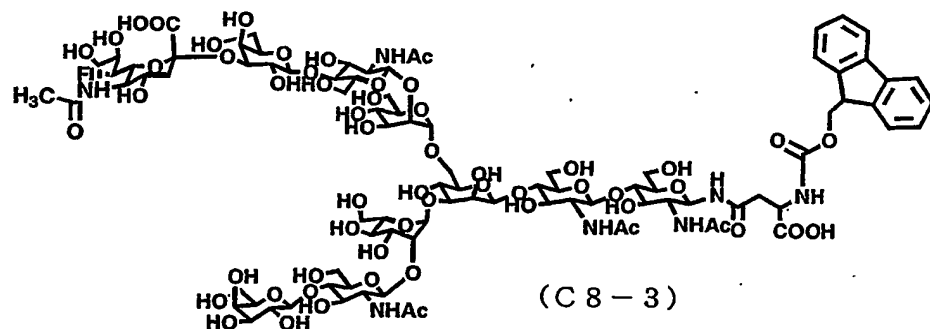
【0125】

【化55】



【0126】

【化56】



【0127】

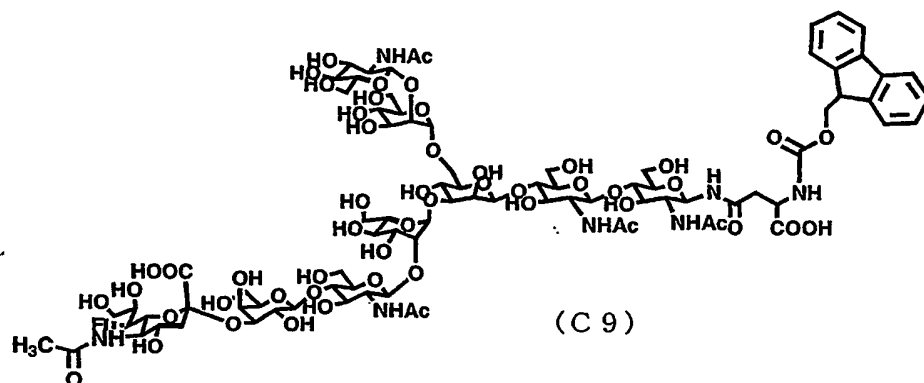
## 実施例9

実施例2の化合物(C1-2)の代りに実施例8で得られた化合物(C8-2)を使用した以外は実施例2と同様にして目的とする化合物(C9)が得られた



【0128】

【化57】



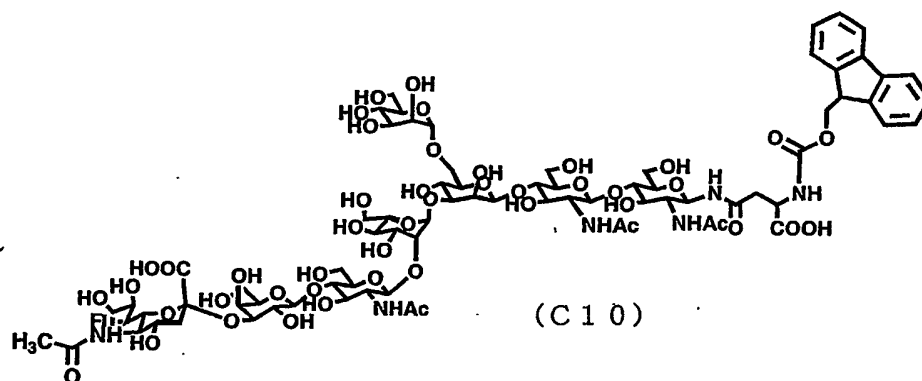
【0129】

## 実施例 10

実施例 3 の化合物 (C2) の代りに実施例 9 で得られた化合物 (C9) を使用した以外は実施例 3 と同様にして目的とする化合物 (C10) が得られた。

【0130】

【化58】



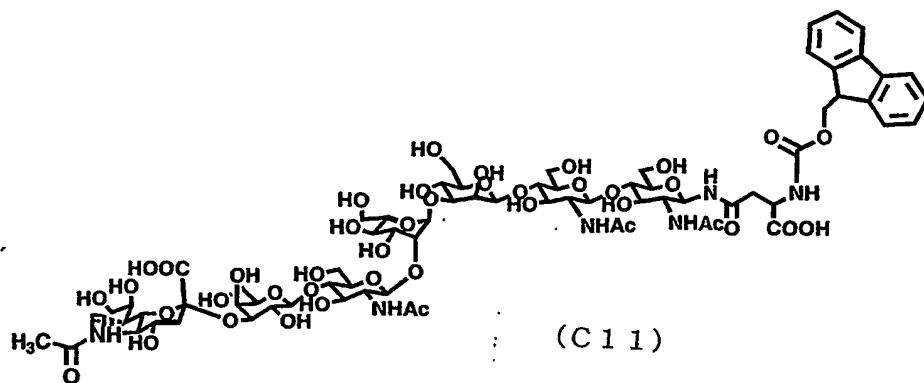
【0131】

## 実施例 11

実施例 4 の化合物 (C3) の代りに実施例 10 で得られた化合物 (C10) を使用した以外は実施例 4 と同様にして目的とする化合物 (C11) が得られた。

【0132】

【化 59】



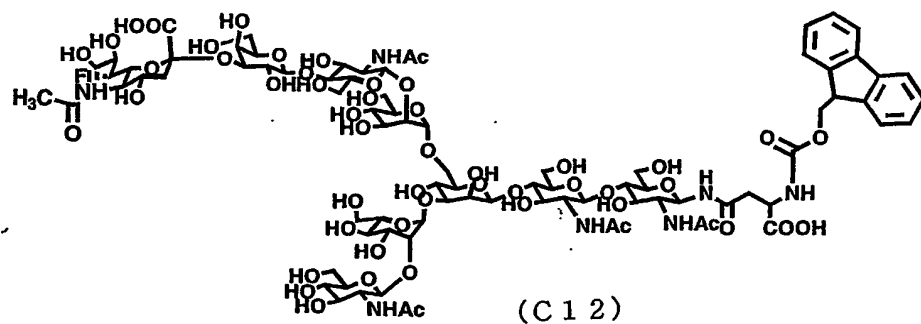
【0133】

## 実施例 12

実施例 5 の化合物 (C 1 - 3) の代りに実施例 8 で得られた化合物 (C 8 - 3) を使用した以外は実施例 5 と同様にして目的とする化合物 (C 1 2) が得られた。

【0134】

【化 60】



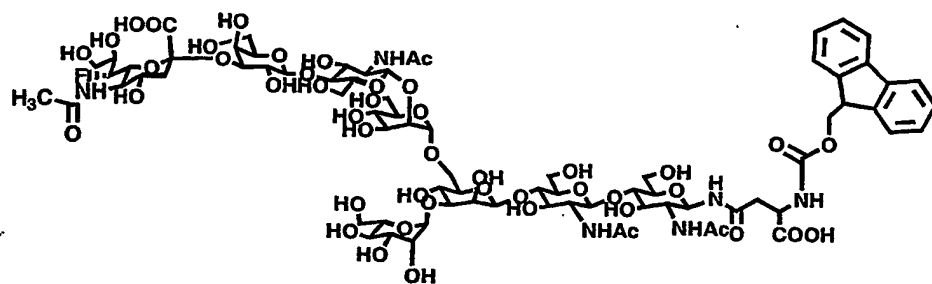
【0135】

## 実施例 13

実施例 6 の化合物 (C 5) の代りに実施例 12 で得られた化合物 (C 1 2) を使用した以外は実施例 6 と同様にして目的とする化合物 (C 1 3) が得られた。

【0136】

## 【化 6 1】



(C 1 3)

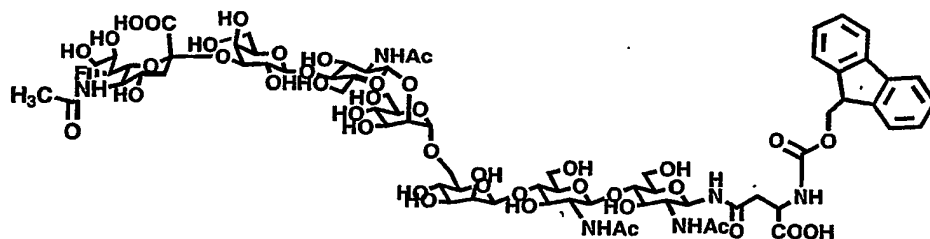
## 【0 1 3 7】

## 実施例 1 4

実施例 7 の化合物 (C 6) の代りに実施例 1 3 で得られた化合物 (C 1 3) を使用した以外は実施例 7 と同様にして目的とする化合物 (C 1 4) が得られた。

## 【0 1 3 8】

## 【化 6 2】



(C 1 4)

## 【0 1 3 9】

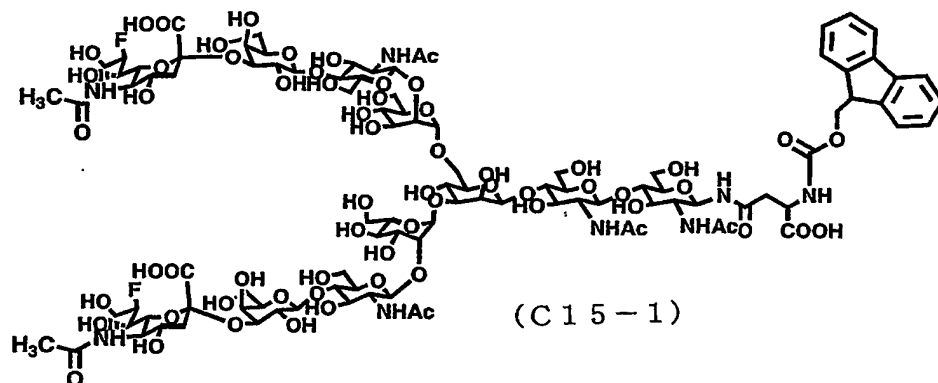
実施例 1 5 Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジ 8''-デオキシ-8''-フルオロ-シアロ α 2, 3 糖鎖アスパラギン (C 1 5-1) および Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護した 2 種のモノ 8''-デオキシ-8''-フルオロ-シアロ α 2, 3 糖鎖アスパラギン (C 1 5-2 及び C 1 5-3) の合成

参考例 9 で得られた CMP-8''-デオキシ-8''-フルオロ-シアル酸を用いた以外は実施例 1 と同様にして下記に示す Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジ 8''-デオキシ-8''-フルオロ-シアロ α 2, 3 糖鎖アス

パラギンおよびFmoc基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護した2種のモノ  
8''-デオキシ-8''-フルオロ-シアロ $\alpha$ 2,3糖鎖アスパラギンを得た。

【0140】

【化63】

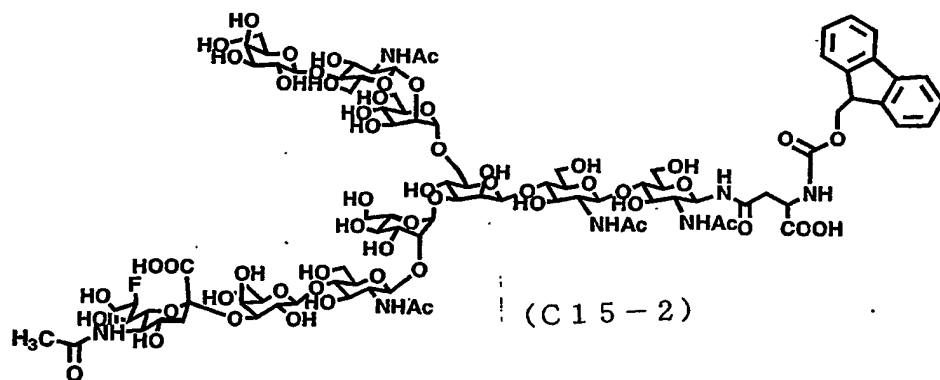


【0141】

この糖鎖アスパラギンは式(1)の $R^1 = R^2 =$ 式(2)、 $R = OH$ 、 $R' = F$ 、 $R'' = OH$ に相当する。

【0142】

【化64】

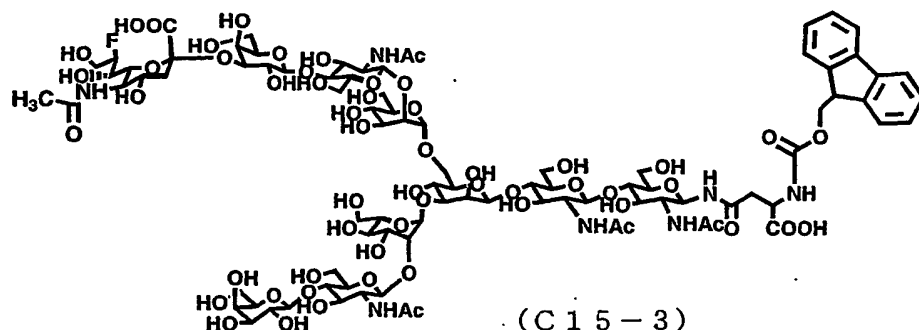


【0143】

この糖鎖アスパラギンは式(1)の $R^1 =$ 式(3)、 $R^2 =$ 式(2)、 $R = OH$ 、 $R' = F$ 、 $R'' = OH$ に相当する。

【0144】

## 【化 6 5】



(C15-3)

## 【0145】

この糖鎖アスパラギンは式(1)の $R^1$ =式(2)、 $R=OH$ 、 $R'=F$ 、 $R''=OH$ 、 $R^2$ =式(3)に相当する。

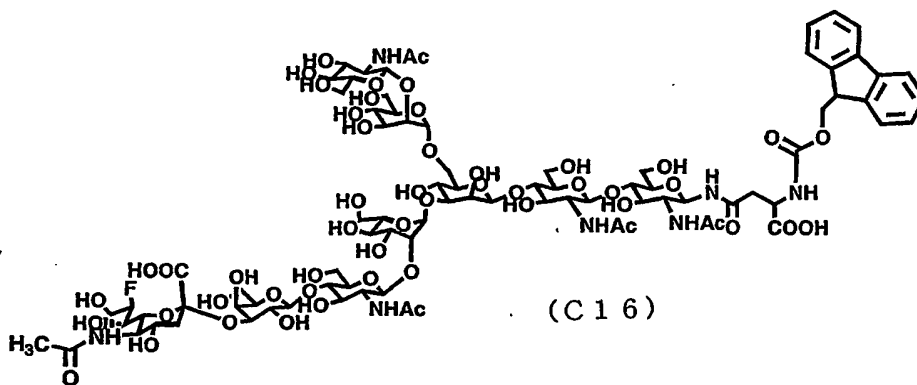
## 【0146】

実施例16 (実施例15のガラクトース加水分解酵素)

実施例2の化合物(C1-2)の代りに実施例15で得られた化合物(C15-2)を使用した以外は実施例2と同様にして目的とする化合物(C16)が得られた。

## 【0147】

## 【化 6 6】



(C16)

## 【0148】

この糖鎖アスパラギンは式(1)の $R^1$ =式(4)、 $R^2$ =式(2)、 $R=OH$ 、 $R'=F$ 、 $R''=OH$ に相当する。

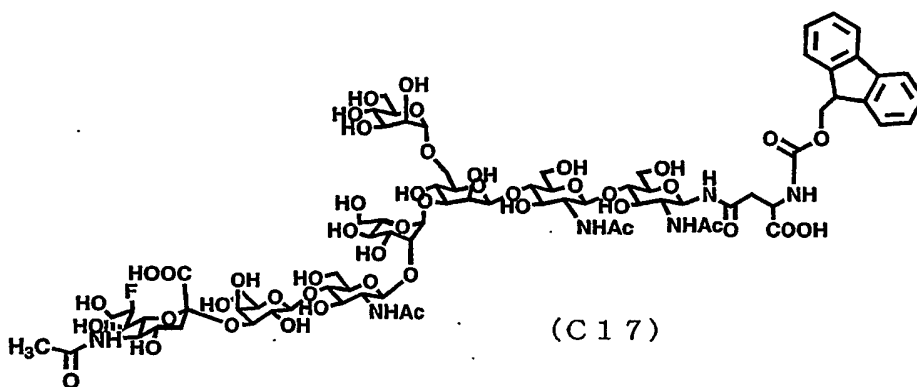
## 【0149】

実施例17 (実施例16のN-アセチルグルコサミン加水分解酵素)

実施例 3 の化合物 (C 2) の代りに実施例 16 で得られた化合物 (C 16) を使用した以外は実施例 3 と同様にして目的とする化合物 (C 17) が得られた。

【0150】

【化 67】



【0151】

この糖鎖アスパラギンは式 (1) の  $R^1 =$  式 (5)、 $R^2 =$  式 (2)、 $R = O$  H、 $R' = F$ 、 $R'' = OH$  に相当する。

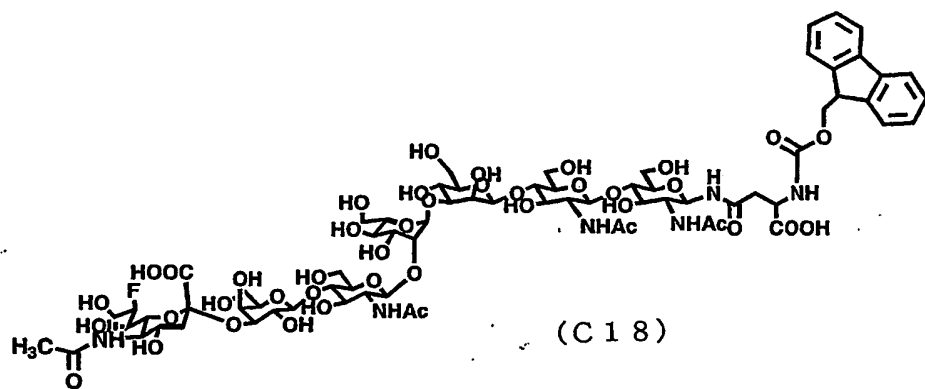
【0152】

実施例 18 (実施例 17 のマンノース加水分解酵素)

実施例 4 の化合物 (C 3) の代りに実施例 17 で得られた化合物 (C 17) を使用した以外は実施例 4 と同様にして目的とする化合物 (C 18) が得られた。

【0153】

【化 68】



【0154】

この糖鎖アスパラギンは式 (1) の  $R^1 = H$ 、 $R^2 =$  式 (2)、 $R = OH$ 、 $R$

' = F、R'' = OH に相当する。

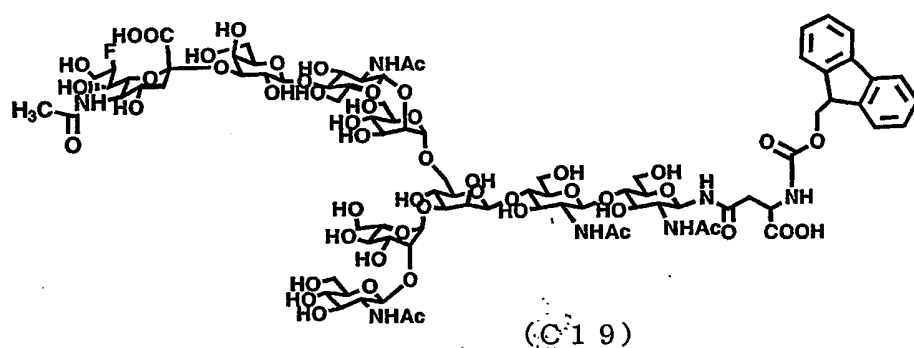
【0155】

実施例 19 (実施例 15 のガラクトース加水分解酵素)

実施例 5 の化合物 (C1-3) の代りに実施例 15 で得られた化合物 (C15-3) を使用した以外は実施例 5 と同様にして目的とする化合物 (C19) が得られた。

【0156】

【化 69】



【0157】

この糖鎖アスパラギンは式 (1) の R<sup>1</sup> = 式 (2)、R = OH、R' = F、R'' = OH、R<sup>2</sup> = 式 (4) に相当する。

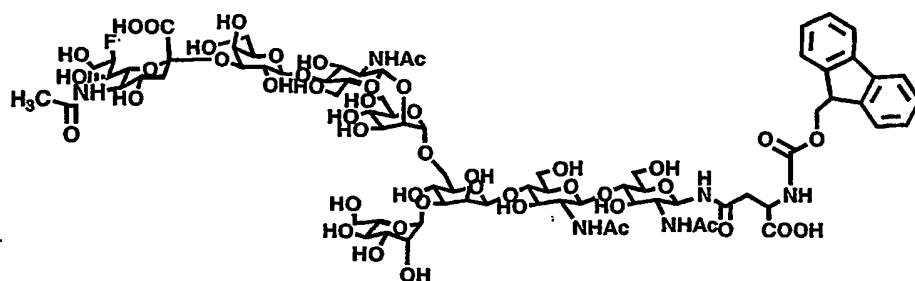
【0158】

実施例 20 (実施例 19 の N-アセチルグルコサミン加水分解酵素)

実施例 6 の化合物 (C5) の代りに実施例 19 で得られた化合物 (C19) を使用した以外は実施例 6 と同様にして目的とする化合物 (C20) が得られた。

【0159】

## 【化 70】



(C 20)

## 【0160】

この糖鎖アスパラギンは式(1)の $R^1$ =式(2)、 $R=OH$ 、 $R'=F$ 、 $R''=OH$ 、 $R^2$ =式(5)に相当する。

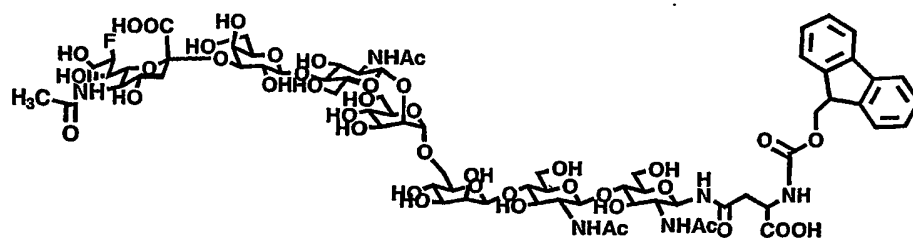
## 【0161】

実施例 21 (実施例 20 のマンノース加水分解酵素)

実施例 7 の化合物 (C 6) の代りに実施例 20 で得られた化合物 (C 20) を使用した以外は実施例 7 と同様にして目的とする化合物 (C 21) が得られた。

## 【0162】

## 【化 71】



(C 21)

## 【0163】

この糖鎖アスパラギンは式(1)の $R^1$ =式(2)、 $R=OH$ 、 $R'=F$ 、 $R''=OH$ 、 $R^2=H$ に相当する。

## 【0164】

実施例 22 Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジ 9''-デオキシ-9''-フルオロ-シアロ $\alpha$ 2,3 糖鎖アスパラギン (C 22-1) および



Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護した 2 種のモノ 9''-デオキシ-9''-フルオローシアロ  $\alpha$  2,3 糖鎖アスパラギン (C22-2 及び C22-3) の合成

参考例 10 で得られた CMP-9''-デオキシ-9''-フルオローシアル酸を用いた以外は実施例 1 と同様にして上記 Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジ 9''-デオキシ-9''-フルオローシアロ  $\alpha$  2,3 糖鎖アスパラギンおよび Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護した 2 種のモノ 9''-デオキシ-9''-フルオローシアロ  $\alpha$  2,3 糖鎖アスパラギンを得た。

#### 【0165】

(C22-1) は式 (1) の  $R^1 = R^2 =$  式 (2)、 $R = OH$ 、 $R' = OH$ 、 $R'' = F$  の糖鎖アスパラギンに相当する。

(C22-2) は式 (1) の  $R^1 =$  式 (3)、 $R^2 =$  式 (2)、 $R = OH$ 、 $R' = OH$ 、 $R'' = F$  の糖鎖アスパラギンに相当する。

(C22-3) は式 (1) の  $R^1 =$  式 (2)、 $R = OH$ 、 $R' = OH$ 、 $R'' = F$ 、 $R^2 =$  式 (3) の糖鎖アスパラギンに相当する。

#### 【0166】

実施例 23 (実施例 22 のガラクトース加水分解酵素)

実施例 2 の化合物 (C1-2) の代りに実施例 22 で得られた化合物 (C22-2) を使用した以外は実施例 2 と同様にして目的とする化合物 (C23) が得られた。

(C23) は式 (1) の  $R^1 =$  式 (4)、 $R^2 =$  式 (2)、 $R = OH$ 、 $R' = OH$ 、 $R'' = F$  の糖鎖アスパラギンに相当する。

#### 【0167】

実施例 24 (実施例 23 の N-アセチルグルコサミン加水分解酵素)

実施例 3 の化合物 (C2) の代りに実施例 23 で得られた化合物 (C23) を使用した以外は実施例 3 と同様にして目的とする化合物 (C24) が得られた。

(C24) は式 (1) の  $R^1 =$  式 (5)、 $R^2 =$  式 (2)、 $R = OH$ 、 $R' = OH$ 、 $R'' = F$  の糖鎖アスパラギンに相当する。

#### 【0168】

**実施例 25 (実施例 24 のマンノース加水分解酵素)**

実施例 4 の化合物 (C 3) の代りに実施例 24 で得られた化合物 (C 24) を使用した以外は実施例 4 と同様にして目的とする化合物 (C 25) が得られた。

(C 25) は式 (1) の  $R^1 = H$ 、 $R^2 =$  式 (2)、 $R = OH$ 、 $R' = OH$ 、 $R'' = F$  の糖鎖アスパラギンに相当する。

【0169】

**実施例 26 (実施例 22 のガラクトース加水分解酵素)**

実施例 5 の化合物 (C 1-3) の代りに実施例 22 で得られた化合物 (C 22-3) を使用した以外は実施例 5 と同様にして目的とする化合物 (C 26) が得られた。

(C-26) は式 (1) の  $R^1 =$  式 (2)、 $R = OH$ 、 $R' = OH$ 、 $R'' = F$ 、 $R^2 =$  式 (4) の糖鎖アスパラギンに相当する。

【0170】

**実施例 27 (実施例 26 の N-アセチルグルコサミン加水分解酵素)**

実施例 6 の化合物 (C 5) の代りに実施例 26 で得られた化合物 (C 26) を使用した以外は実施例 6 と同様にして目的とする化合物 (C 27) が得られた。

(C 27) は式 (1) の  $R^1 =$  式 (2)、 $R = OH$ 、 $R' = OH$ 、 $R'' = F$ 、 $R^2 =$  式 (5) の糖鎖アスパラギンに相当する。

【0171】

**実施例 28 (実施例 27 のマンノース加水分解酵素)**

実施例 7 の化合物 (C 6) の代りに実施例 27 で得られた化合物 (C 27) を使用した以外は実施例 7 と同様にして目的とする化合物 (C 28) が得られた。

(C 28) は式 (1) の  $R^1 =$  式 (2)、 $R = OH$ 、 $R' = OH$ 、 $R'' = F$ 、 $R^2 = H$  の糖鎖アスパラギンに相当する。

【0172】

実施例 29 Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジ 7''-デオキシ-7''-フルオロ-シアロ (2-6) 糖鎖アスパラギン (C 29-1) および Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護した 2 種のモノ 7''-デオキシ-7''-フルオロ-シアロ (2-6) 糖鎖アスパラギン (C 29-2 及び C 2

## 9-3) の合成

参考例 7 で得られた CMP-7"-デオキシ-7"-フルオロ-シアル酸を、シアル酸転移酵素として  $\alpha$  2, 6 転移酵素である市販の Rat Liver 由来のものを用い、カコジル酸緩衝溶液の pH を 6.0 とした以外は実施例 1 と同様にして下記に示す Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジ 7"-デオキシ-7"-フルオロ-シアロ (2-6) 糖鎖アスパラギンおよび Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護した 2 種のモノ 7"-デオキシ-7"-フルオロ-シアロ (2-6) 糖鎖アスパラギンを得た。(C 29-1) ~ (C 29-3) の化学式を図 1 に示す。

## 【0173】

## 実施例 30 (実施例 29 のガラクトース加水分解酵素)

実施例 2 の化合物 (C 1-2) の代りに実施例 29 で得られた化合物 (C 29-2) を使用した以外は実施例 2 と同様にして目的とする化合物 (C 30) が得られた。(C 30) の化学式を図 2 に示す。

## 【0174】

## 実施例 31 (実施例 30 の N-アセチルグルコサミン加水分解酵素)

実施例 3 の化合物 (C 2) の代りに実施例 30 で得られた化合物 (C 30) を使用した以外は実施例 3 と同様にして目的とする化合物 (C 31) が得られた。(C 31) の化学式を図 2 に示す。

## 【0175】

## 実施例 32 (実施例 31 のマンノース加水分解酵素)

実施例 4 の化合物 (C 3) の代りに実施例 31 で得られた化合物 (C 31) を使用した以外は実施例 4 と同様にして目的とする化合物 (C 32) が得られた。(C 32) の化学式を図 2 に示す。

## 【0176】

## 実施例 33 (実施例 29 のガラクトース加水分解酵素)

実施例 5 の化合物 (C 1-3) の代りに実施例 29 で得られた化合物 (C 29-3) を使用した以外は実施例 5 と同様にして目的とする化合物 (C 33) が得られた。(C 33) の化学式を図 3 に示す。

## 【0177】

実施例 34 (実施例 33 の N-アセチルグルコサミン加水分解酵素)

実施例 6 の化合物 (C5) の代りに実施例 33 で得られた化合物 (C33) を使用した以外は実施例 6 と同様にして目的とする化合物 (C34) が得られた。(C34) の化学式を図 3 に示す。

## 【0178】

実施例 35 (実施例 34 の マンノース加水分解酵素)

実施例 7 の化合物 (C6) の代りに実施例 34 で得られた化合物 (C34) を使用した以外は実施例 7 と同様にして目的とする化合物 (C35) が得られた。(C35) の化学式を図 3 に示す。

## 【0179】

実施例 36 ~ 49

以下、同様にして図 4 ~ 図 9 に示す糖鎖アスパラギン誘導体を合成した。

## 【0180】

実施例 50 (糖鎖アスパラギン誘導体の Fmoc 基の脱保護)

全ての糖鎖アスパラギン誘導体において、以下の手順で Fmoc 基の脱保護を行った。まず、糖鎖アスパラギン Fmoc 体 1  $\mu$ mol あたりに 240  $\mu$ リットルの N,N-ジメチルホルムアミド、160  $\mu$ リットルのモルホリンを加え、室温・アルゴン雰囲気下で反応させた。TLC (展開溶媒として 1M 酢酸アンモニウム: イソプロパノール = 8:5 を用いた) にて反応終了を確認した後、氷水で冷却した。ここにジエチルエーテルを反応溶液の 10 倍量加えて 15 分間攪拌した後、析出した沈殿物をろ別した。得られた残渣を水に溶解させ、35℃でエバポレートした。更にトルエンを 3ml 加えエバポレートするという操作を 3 回繰り返した。残留物を逆相カラムクロマトグラフィー (コスモシール 75C18-OPN、15×100mm、展開溶媒は水) により精製して、対応する糖鎖アスパラギンを得た。

## 【0181】

実施例 51 (糖鎖アスパラギンのアスパラギン残基の除去)

実施例 50 で得られた糖鎖アスパラギンを無水ヒドラジンと反応させた後、ア

セチル化することによりアスパラギン残基を除去して対応する糖鎖を得た。

【0182】

【発明の効果】

本発明によれば、少なくとも1種以上のシアル酸あるいはシアル酸の誘導体を非還元末端に含む新規な糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギンおよび糖鎖を安価かつ効率的に大量に製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の実施例で得られた糖鎖アスパラギン誘導体の化学式を示す。

【図2】 本発明の実施例で得られた糖鎖アスパラギン誘導体の化学式を示す。

【図3】 本発明の実施例で得られた糖鎖アスパラギン誘導体の化学式を示す。

【図4】 本発明の実施例で得られた糖鎖アスパラギン誘導体の化学式を示す。

【図5】 本発明の実施例で得られた糖鎖アスパラギン誘導体の化学式を示す。

【図6】 本発明の実施例で得られた糖鎖アスパラギン誘導体の化学式を示す。

【図7】 本発明の実施例で得られた糖鎖アスパラギン誘導体の化学式を示す。

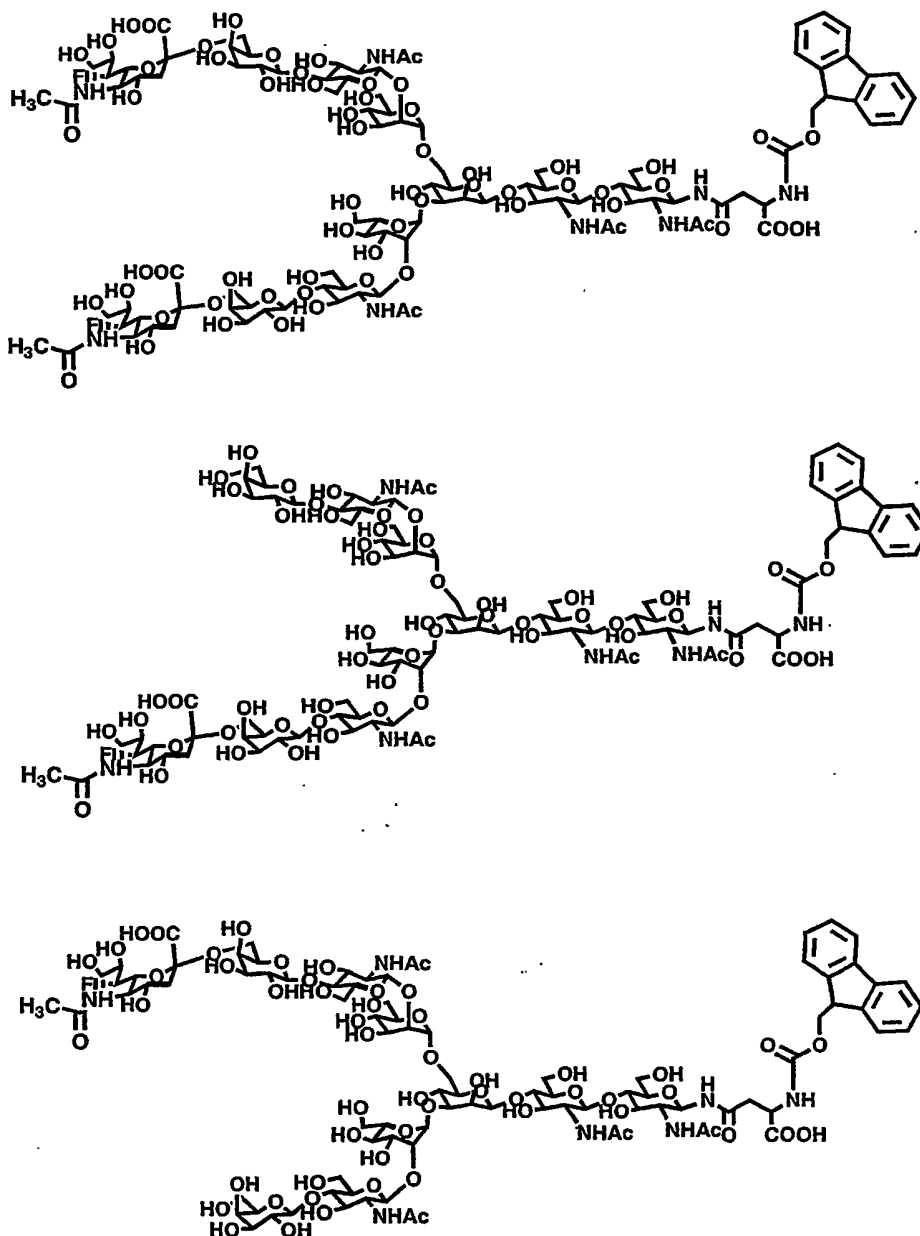
【図8】 本発明の実施例で得られた糖鎖アスパラギン誘導体の化学式を示す。

【図9】 本発明の実施例で得られた糖鎖アスパラギン誘導体の化学式を示す。

【書類名】 図面

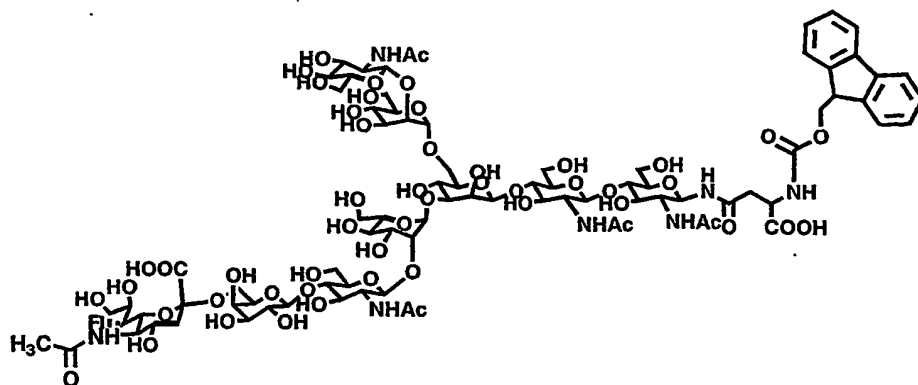
【図 1】

実施例 29

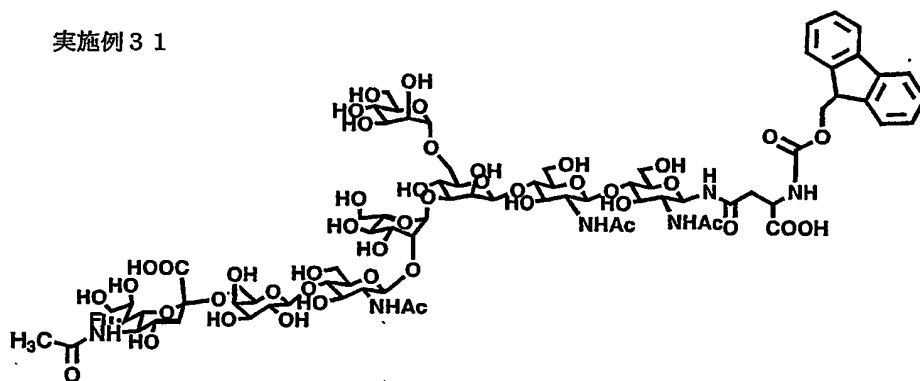


【図 2】

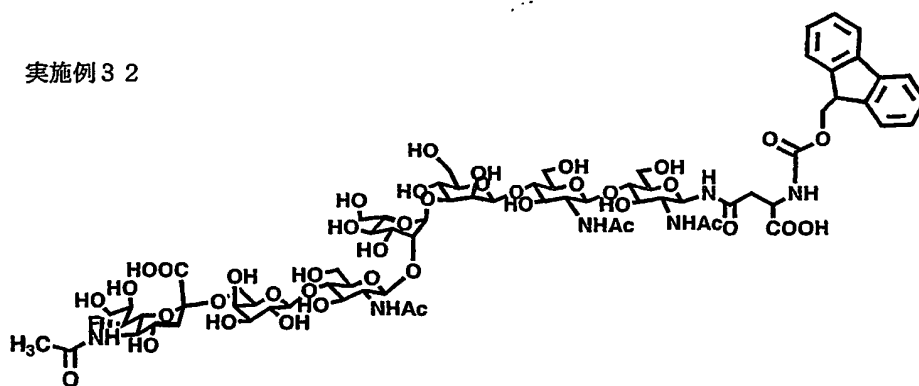
実施例 30



実施例 31

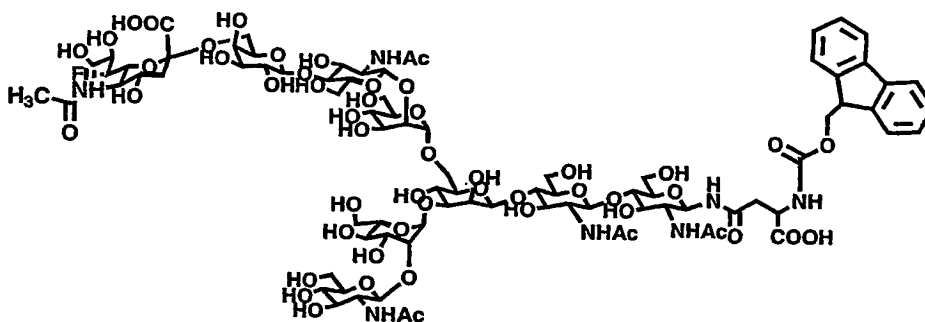


実施例 32

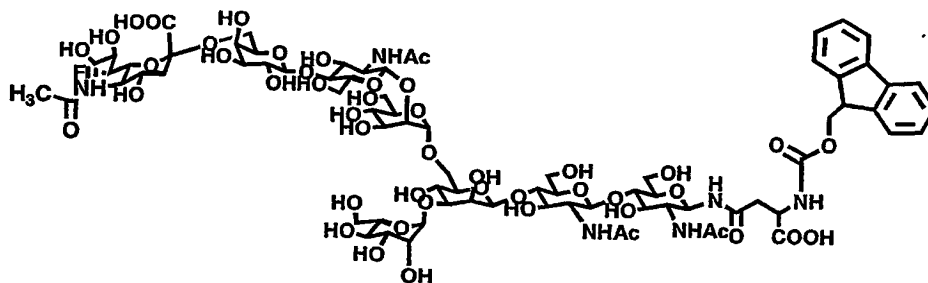


【図 3】

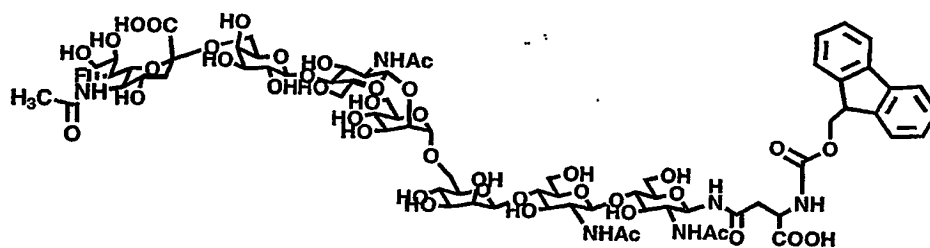
実施例 3 3



実施例 3 4



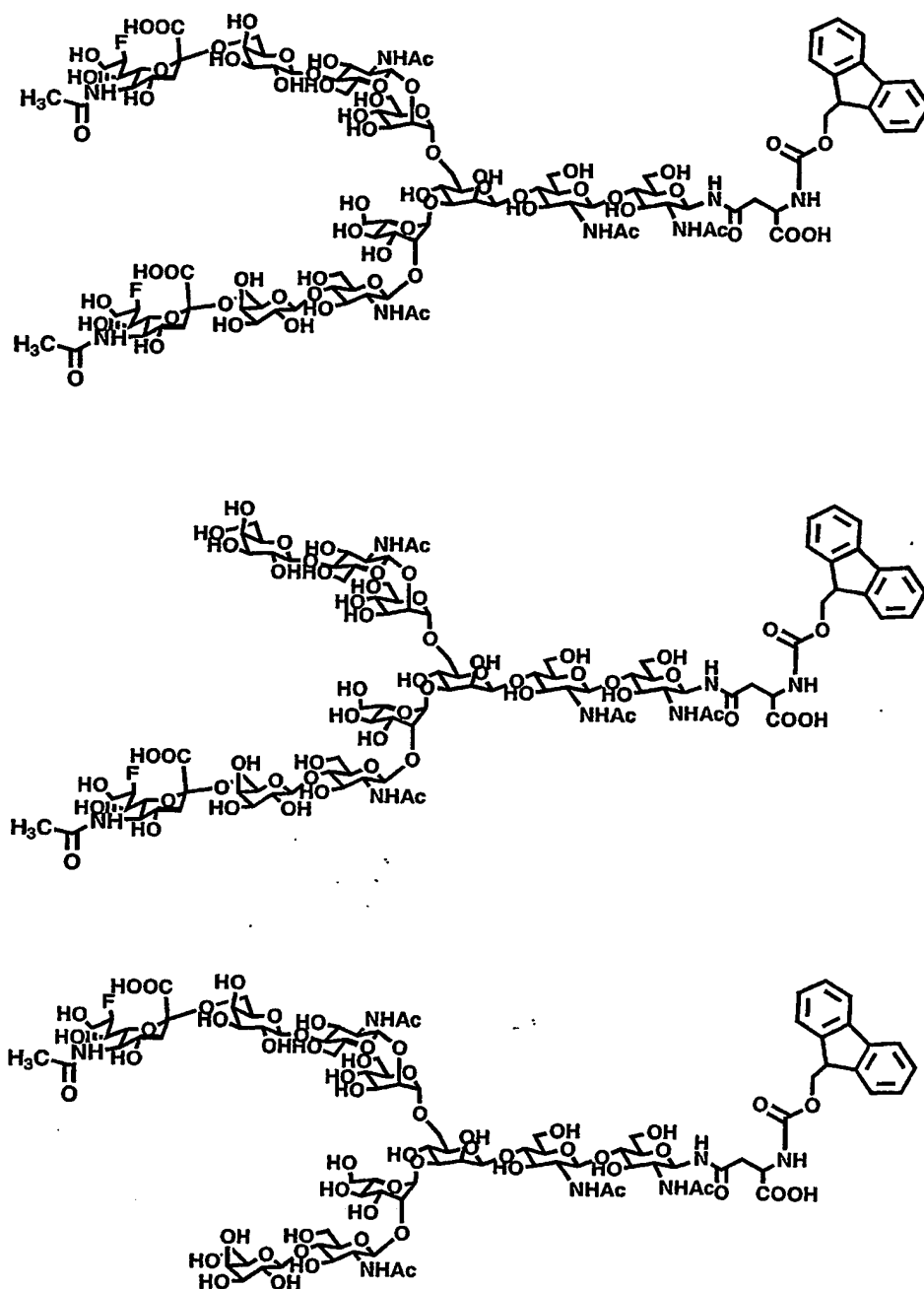
実施例 3 5





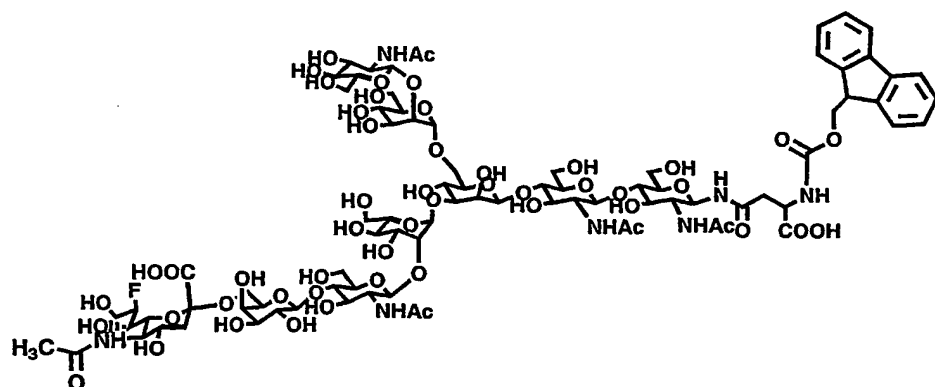
【図 4】

実施例 36

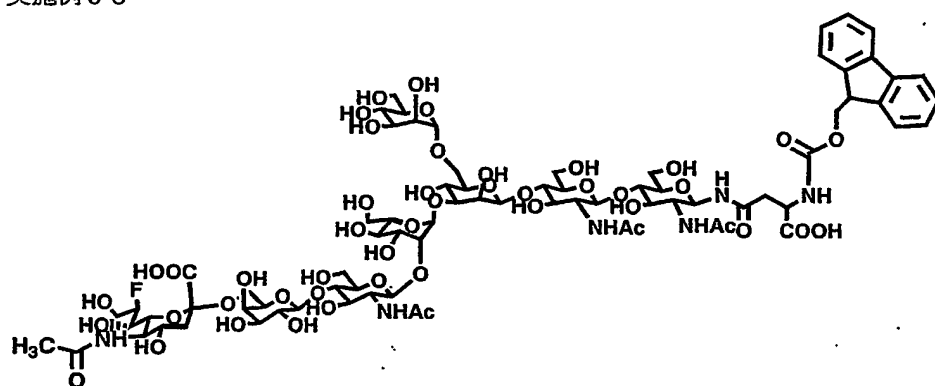


【図 5】

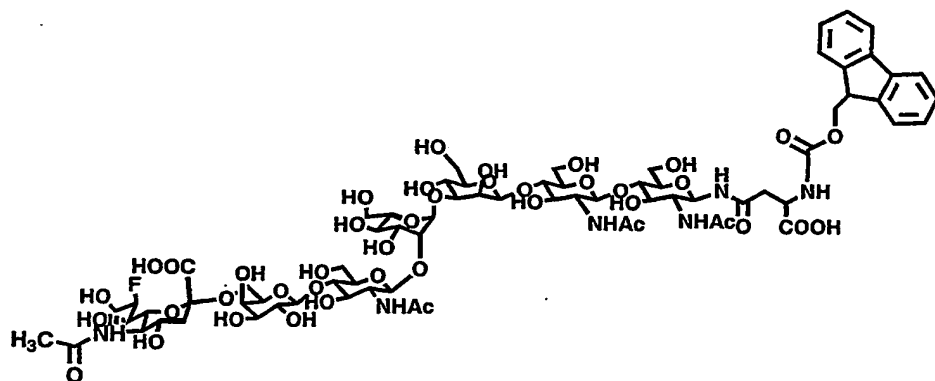
実施例 37



実施例 38

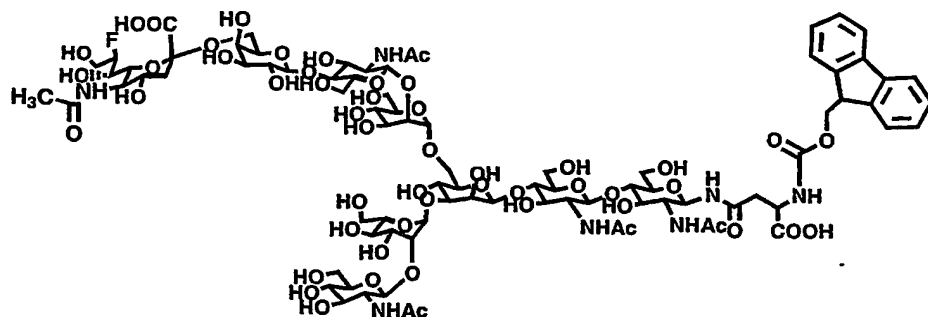


実施例 39

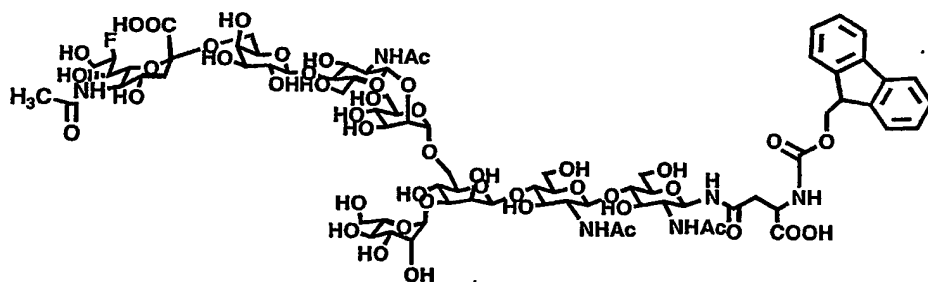


【図 6】

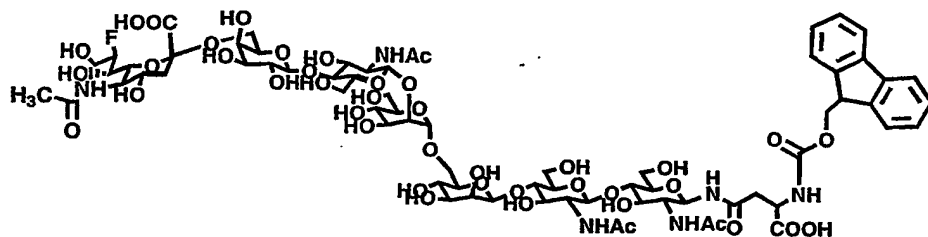
実施例 40



実施例 41

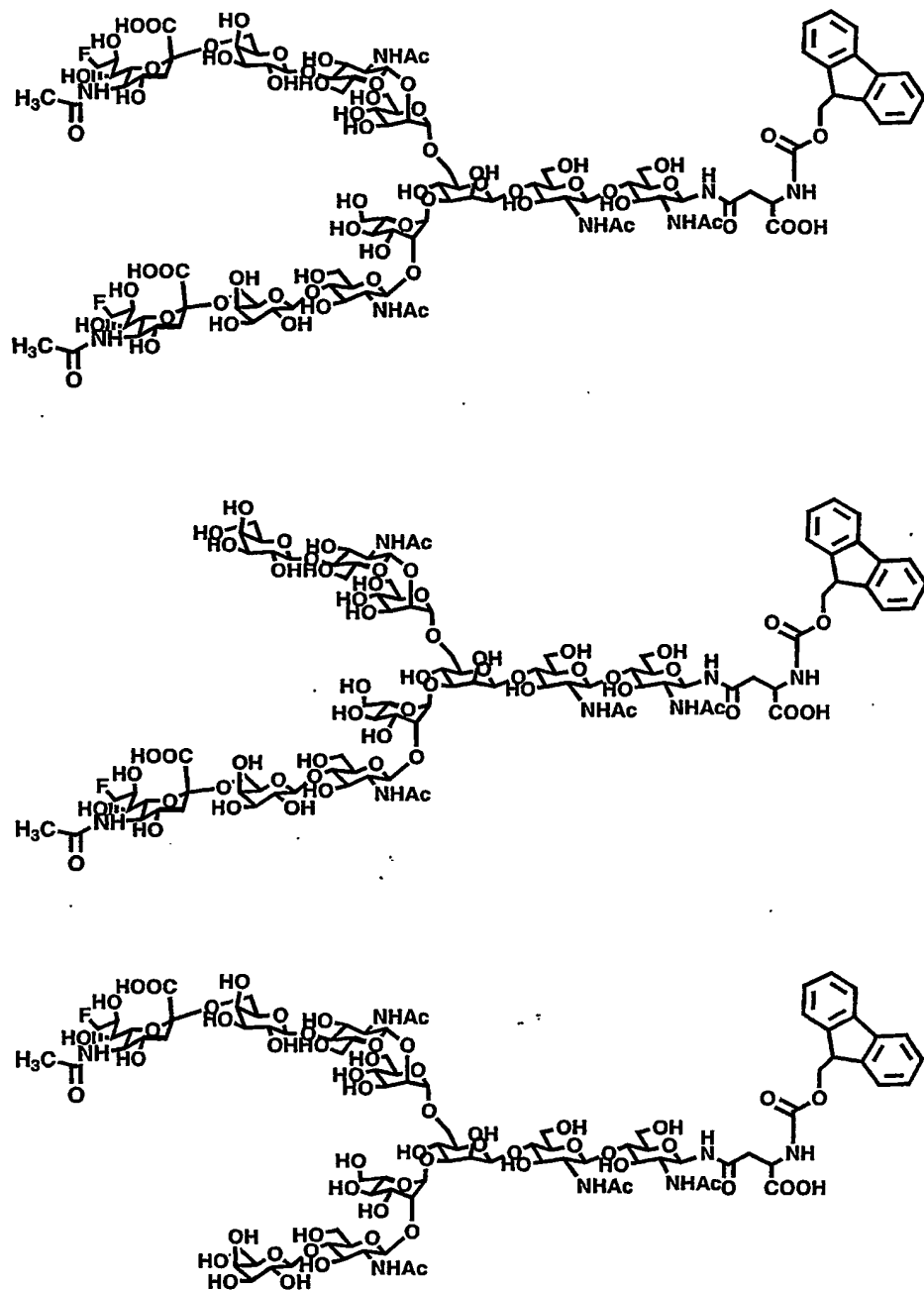


実施例 42



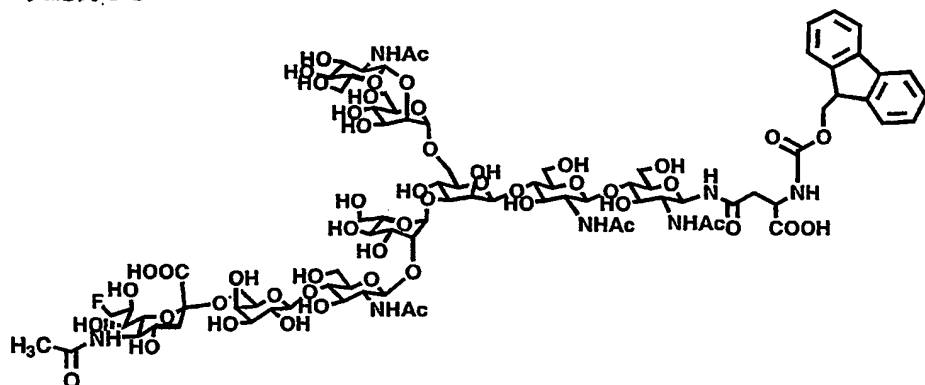
【図 7】

実施例 4 3

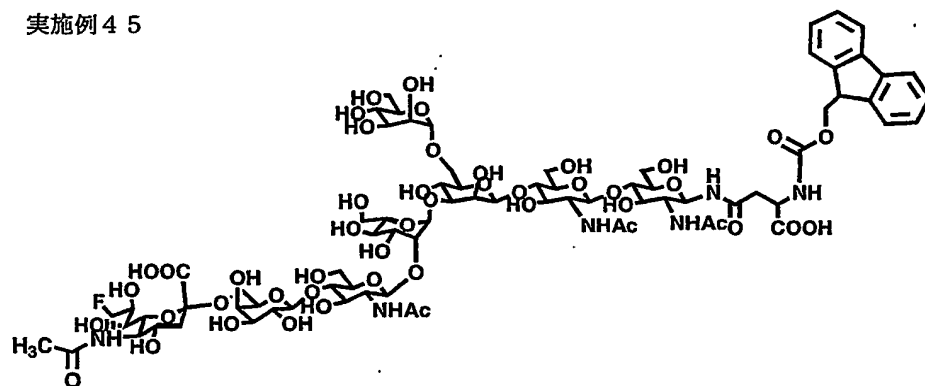


【図 8】

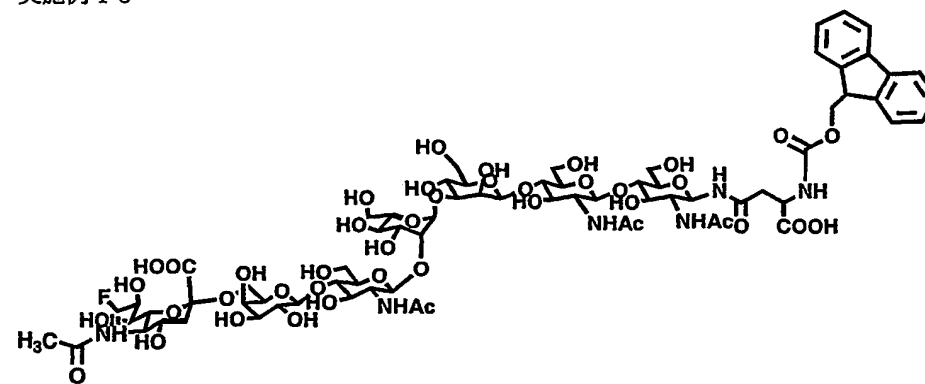
実施例 4 4



実施例 4 5

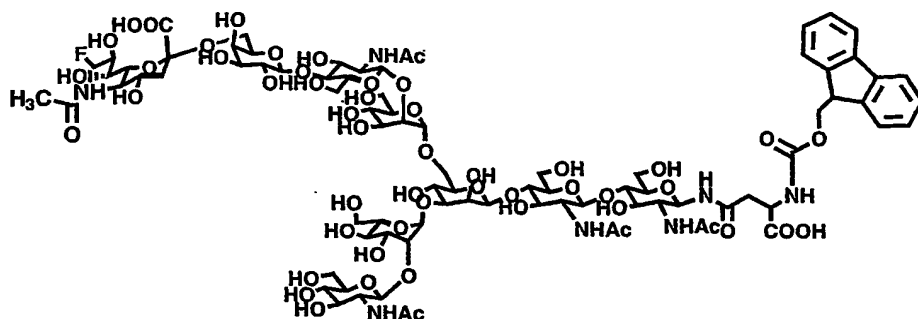


実施例 4 6

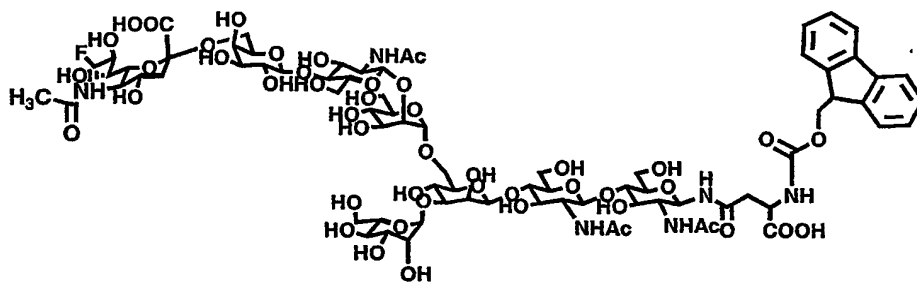


【図 9】

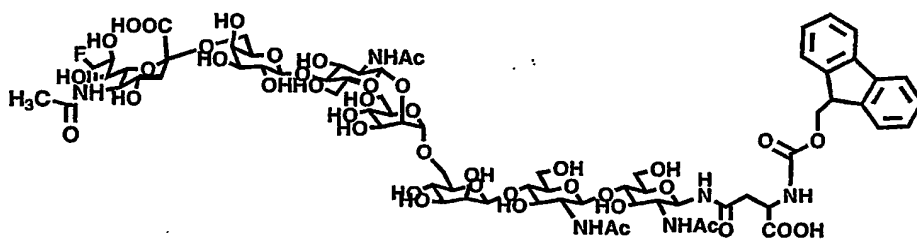
実施例 4 7



実施例 4 8



実施例 4 9



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 少なくとも 1 種以上のシアル酸あるいはシアル酸の誘導体を非還元末端に含む新規な糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギンおよび糖鎖を提供する。

【解決手段】 シアル酸あるいはシアル酸の誘導体を非還元末端に含む 11～7 糖を有する  $\alpha$  2, 3 又は  $\alpha$  2, 6 糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギンおよび糖鎖。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-373213
受付番号	50201954672
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 1月 6日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年12月24日
-------	-------------

次頁無



特願 2002-373213

出願人履歴情報

識別番号

[502244258]

1. 変更年月日  
[変更理由]

2002年 7月 5日

新規登録

住 所  
氏 名

神奈川県横浜市都筑区牛久保東2-4-2-205  
梶原 康宏

特願 2 0 0 2 - 3 7 3 2 1 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 0 2 0 6 0 3 0 6 ]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 1 0 月 1 5 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区大手通 3 丁目 2 番 2 7 号

氏 名

大塚化学株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

### **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**